

THESIS / THÈSE

LICENCE EN BIOLOGIE

Production et caractérisation d'anticorps contre une UDP-glucose déhydrogénase d'*Arabidopsis thaliana*

Müller, Nathalie

Award date:
2001

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**PRODUCTION ET CARACTERISATION D'ANTICORPS CONTRE UNE UDP-
GLUCOSE DEHYDROGENASE D'*ARABIDOPSIS THALIANA***

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Nathalie MULLER

Juin 2001

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

PRODUCTION ET CARACTERISATION D'ANTICORPS CONTRE UNE UDP- GLUCOSE DEHYDROGENASE

MULLER Nathalie

Résumé

Ce mémoire s'inscrit dans le cadre d'un projet visant à générer un pool de sondes immunologiques dirigées contre des enzymes intervenant dans la biosynthèse de la paroi cellulaire végétale. Le but particulier de ce travail est d'obtenir un polysérum spécifique des UDP-glucose déhydrogénases végétales (UDP-gldh), enzymes impliquées dans la biosynthèse des précurseurs polysaccharidiques de la paroi. La stratégie choisie a été d'immuniser un lapin et une poule à l'aide de deux peptides synthétiques couplés à la KLH, choisis dans des zones conservées entre les différentes séquences d'UDP-gldh végétales présentes dans les banques de données. En parallèle à ce volet d'immunisation, nous avons procédé au clonage du gène codant pour une UDP-gldh d'*Arabidopsis thaliana* ; la protéine correspondante a ensuite été exprimée en bactérie. L'UDP-gldh recombinante a été purifiée et utilisée comme contrôle positif dans des tests de type dot-blot et Western-blot afin d'évaluer la spécificité des anticorps produits par les animaux immunisés. Nos résultats confirment le caractère immunogénique des peptides synthétiques couplés, qui constituent une bonne alternative à l'utilisation de protéines exprimées sous forme recombinante puis purifiées pour les immunisations. Tant le polysérum de lapin que les anticorps préparés au départ d'œufs de poule sont capables de détecter la présence d'UDP-gldh recombinante dans des extraits protéiques bactériens. Cette réponse spécifique est toutefois accompagnée, dans le cas des anticorps de poule, d'un bruit de fond particulièrement élevé dû à la fixation d'anticorps sur des protéines de *coli*.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2001

Promoteur: P. VAN CUTSEM

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Pierre VAN CUTSEM pour m'avoir permis de réaliser mon mémoire au sein de son laboratoire.

Pour son aide et ses judicieux conseils, au cours de cette année, un grand merci à Françoise LINERS.

Merci également à Cindy BENET pour m'avoir montré les ficelles du métier à la paillasse et pour les moments de détente.

Sans oublier Françoise, Yohan et Pierre, pour leur bonne humeur et leur constante disponibilité. Annabelle et Stéphanie, merci pour vos conseils et votre gentillesse.

Merci à tous les membres du labo.

Toute ma reconnaissance s'adresse aux membres du Jury qui ont accepté de consacrer une part de leur temps à la lecture de cet ouvrage.

Toute ma gratitude à mes amis et amies pour leur soutien à tout moment.

Un merci tout particulier à mes parents.

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration et à la réalisation de ce mémoire, **MERCI.**

INTRODUCTION

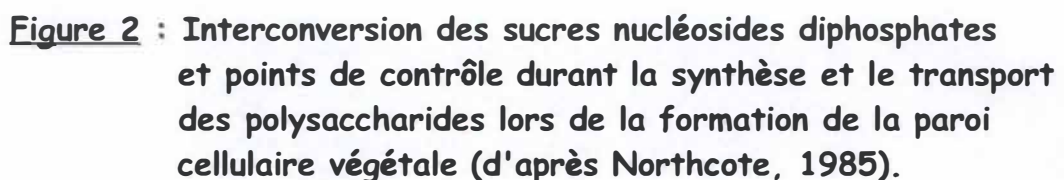
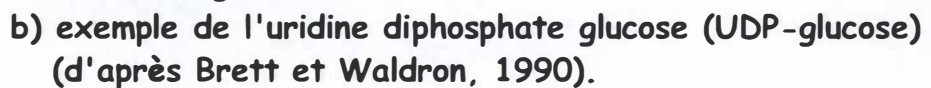
1. LA COMPLEXITE DE LA PAROI CELLULAIRE VEGETALE

Les cellules végétales sont entourées d'une paroi primaire principalement composée de microfibrilles de cellulose et de polysaccharides matriciels très complexes tels que les hémicelluloses et les pectines. Cette paroi joue un rôle fondamental tant dans le contrôle de la croissance et de la morphogenèse des végétaux que dans la résistance de ceux-ci aux organismes pathogènes (Carpita et Gibeaut, 1993 ; Edwards *et al.*, 1999). Ces dernières années ont mis en évidence la forte hétérogénéité des parois : les parois de différentes cellules ont non seulement des compositions distinctes mais plusieurs polymères matriciels peuvent être concentrés dans plusieurs couches d'une même paroi. De plus, différents domaines ou différentes régions d'une même paroi peuvent être de compositions très dissemblables (Roberts, 2001). Ceci illustre clairement l'importance de la complexité des parois cellulaires végétales.

Alors que la structure des polymères qui composent la paroi est globalement élucidée (Carpita et Gibeaut, 1993), le mécanisme qui contrôle sa croissance reste à découvrir (<http://www.plbio.kvl.dk/plbio/cellwall.htm> ; Reid, 2000). Le processus aboutissant à la synthèse des polysaccharides pariétaux est en effet encore mal connu et les données quant à sa régulation restent lacunaires (Wulff *et al.*, 2000 ; <http://www.pre.msu.edu/keegstra.htm>). La synthèse des polysaccharides de la paroi cellulaire végétale résulte d'un processus complexe faisant appel à de nombreuses voies biochimiques : contrairement aux protéines qui résultent de la transcription et traduction d'un gène donné, les polysaccharides sont le fruit de l'interaction de nombreuses enzymes individuellement régulées, elles-mêmes issues de la transcription et traduction de gènes.

Nous allons ci-après passer en revue les principales données de la littérature relatives à ces voies de synthèse de la paroi.

• An example:



2. LA BIOSYNTHESE DE LA PAROI CELLULAIRE VEGETALE

2.1 Le processus de biosynthèse

Nous allons décrire dans ce chapitre les mécanismes généraux de la biosynthèse des polysaccharides des hémicelluloses et des pectines. Nous n'aborderons pas le cas particulier de la cellulose.

Habituellement, on distingue différentes phases dans le processus de synthèse des polysaccharides de la paroi cellulaire végétale : 1° la formation des précurseurs, 2° la polymérisation, 3° les modifications post-synthétiques. Celles-ci seront explicitées ci-dessous. Nous parlerons également de la régulation de cette biosynthèse.

2.1.1 La formation des précurseurs

Les substrats servant à la biosynthèse des polysaccharides de la paroi cellulaire végétale appartiennent à la classe des sucres nucléotides ou sucres diphospho- nucléosidiques (Scheller, 1999). Ces composés contiennent un monosaccharide attaché au β -phosphate d'un ribonucléoside diphosphate. La base dans le nucléoside est souvent une guanine ou un uracile (Figure 1). Diverses sortes de nucléotidyltransférases agissent dans les tissus des plantes, chacune catalysant la formation d'un sucre nucléoside diphosphate précis. Par conséquent, à condition que le monosaccharide phosphate et le nucléotide soient disponibles, les plantes sont capables de synthétiser un large éventail de sucres nucléotides diphosphates à travers l'activité de ces enzymes (Smith, 1993 ; Carpita et McCann, 2000).

L'UDP-glucose, par l'intermédiaire d'enzymes telles que des épimérase, déshydrogénases et déhydratases, sert de principal précurseur pour la synthèse de divers nucléotides tels que l'UDP-glucuronate, l'UDP-rhamnose, l'UDP-galacturonate, l'UDP-xylose, l'UDP-arabinose,... (Figure 2). Tous ces différents composés ainsi que les enzymes impliquées dans leur formation seraient localisés dans le cytosol, bien que cela ne soit pas admis par tous les auteurs. Comme exemple citons le cas notamment de la sucrose synthase qui catalyse l'hydrolyse du sucrose en UDP-glucose et en fructose, et qui selon certains serait surtout cytoplasmique (Chengappa *et al.*, 1999), alors que pour d'autres elle serait membranaire, localisée soit dans les membranes du Golgi, soit dans les membranes plasmiques (Buckeridge *et al.*, 1999).

2.1.2 La polymérisation

La formation des chaînes de polysaccharides est réalisée par des enzymes membranaires, les glycosyltransférases ou polysaccharides synthases, qui transfèrent des monosaccharides à partir de sucres nucléotides, sur une chaîne polysaccharidique en croissance, à l'extrémité non réductrice. Signalons que ce qui n'était alors qu'une présupposition a été prouvé récemment pour l'homogalacturonane synthase, enzyme qui participe à l'élaboration du squelette pectique, où l'ajout de résidus acides galacturoniques à l'extrémité non réductrice de la chaîne pectique a été démontré (Scheller, 1999). La spécificité des enzymes de biosynthèse est telle qu'une enzyme différente est requise pour l'addition de chaque type de monosaccharide à la chaîne polysaccharidique en croissance, ce qui conduit à prédire l'existence de centaines de glycosyltransférases différentes chez les organismes multicellulaires. Cette hypothèse a pu être confirmée via la disponibilité des informations de séquences génomiques qui a permis l'identification d'environ 350 gènes potentiels de glycosyltransférases dans le génome d'*Arabidopsis* (Keegstra et Raikhel, 2001). Par exemple, la synthèse des pectines nécessiterait, à elle seule, l'activité d'au moins 53 transférases différentes (Monhen, 1999). Afin de comprendre comment ces nombreuses activités enzymatiques distinctes sont coordonnées et comment se déroule la régulation de leur action afin d'aboutir à la synthèse d'une même molécule, les enzymes de biosynthèse des polysaccharides doivent être identifiées et les gènes correspondants clonés. Seules deux de ces enzymes l'ont été jusqu'à présent : la fucosyltransférase (Perrin *et al.*, 1999) et la galactosyltransférase (Edwards *et al.*, 1999).

La matrice polysaccharidique est formée dans le système endomembranaire de la cellule (Figure 2). L'activité des glycosyltransférases intervenant dans la synthèse des polysaccharides de la matrice pariétale a été localisée au niveau de l'appareil de Golgi (Carpita et McCann, 2000). Les polysaccharides formés transitent à travers le Golgi et sont transportés vers la membrane plasmique par les vésicules. Arrivées à la membrane plasmique, les vésicules fusionnent avec celle-ci et les polysaccharides nouvellement synthétisés sont relargués et intégrés dans la paroi cellulaire. Le temps de transit du réticulum endoplasmique à la paroi cellulaire serait de l'ordre de 20 à 30 minutes (Smith, 1993). Ce sont des expériences réalisées à l'aide de sucres marqués ^3H qui ont permis de localiser les différentes étapes de ce processus (Reid, 2000).

2.1.3 Les modifications post-synthétiques

Peu de choses sont connues à ce propos, mis à part que des modifications sont réalisées au niveau des polysaccharides après la polymérisation initiale. Par exemple, des groupes méthyles et/ou acétyles sont ajoutés aux galacturonanes (pectines) et glucuronoxylanes (hémicelluloses) après leur polymérisation au niveau de l'appareil de Golgi (Goubet et Monhen, 1999).

2.2 Le contrôle de la biosynthèse

Le fait que la composition de la paroi change fortement durant la croissance (Monnier, 1999) et la différenciation cellulaire suggèrent l'existence d'un processus de régulation de la synthèse de ses composants. Il semblerait que la synthèse des polysaccharides soit principalement régulée par la disponibilité des précurseurs, les sucres diphosphonucléosidiques, et par la variation du taux de polysaccharides synthases (Brett et Waldron, 1990).

Durant la transition de la formation de la paroi primaire à l'épaississement de la paroi secondaire (stade final de la différenciation), on constate une diminution de l'activité des enzymes directement impliquées dans la production des précurseurs solubles des pectines, et une augmentation de l'activité des enzymes intervenant dans la production des précurseurs des hémicelluloses. Le contrôle du pool des précurseurs constituerait ainsi un moyen de régulation de la synthèse des pectines et des hémicelluloses (Brett et Waldron, 1990) .

Comme nous l'avons dit précédemment, les enzymes de synthèse des polysaccharides, les synthases, se situent dans la lumière des endomembranes, alors que leurs substrats, les sucres nucléosides diphosphates, sont formés dans le cytosol. Il doit donc se produire un transport des sucres diphosphonucléosidiques du cytosol vers l'intérieur des citernes des dictyosomes (Nebenfurhr et Staehelin, 2001). Ce transport pourrait être contrôlé par des perméases ou par les polysaccharides synthases elles-mêmes (Brett et Waldron, 1990). Ce processus de transport n'est toutefois pas encore connu. Jusqu'à présent une seule protéine impliquée dans le transport de monosaccharide a été caractérisée au niveau moléculaire : c'est une RGP (Reversibly Glycosylated Protein) localisée dans les membranes des citernes des dictyosomes. Elle jouerait un rôle d'accepteur primaire de glucose, xylose et galactose à partir

des sucres diphosphonucléosidiques correspondants, permettant l'utilisation de ces monomères par des transférases (Dhugga *et al.*, 1997). De plus Wulff et ses collaborateurs ont montré que le transport de GDP-fucose était médié par une protéine et que ce transporteur était différent du transporteur d'UDP-glucose (Wulff *et al.*, 2000). On suppose qu'il doit exister au moins deux systèmes, différents pour le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Brett et Waldron, 1990). Quel que soit le mécanisme, ce transport est un important point de contrôle pour la production des polysaccharides : bien que les enzymes de polymérisation soient présentes dans les citernes du Golgi, elles ne devraient pas être fonctionnelles à moins que les substrats ne soient disponibles pour elles. Généralement aussi, les activités et probablement la quantité de synthases reflètent la quantité de polysaccharides déposés sur la paroi à un stade particulier de différenciation (Northcote, 1985).

La fusion des vésicules Golgiennes contenant les polymères nouvellement synthétisés avec la membrane plasmique étant un processus Ca^{2+} dépendant, le processus de sécrétion des polysaccharides pourrait également constituer un autre moyen de régulation (Northcote, 1985).

Les principales données relatives à la synthèse de la paroi que nous venons d'énumérer résultent essentiellement d'une approche biochimique du processus, effectuée au départ d'enzymes purifiées dont on analyse ensuite l'activité. La principale difficulté dans ce type d'étude est d'obtenir l'enzyme cible sous forme très pure (Reid, 2000), de manière à pouvoir l'identifier sans ambiguïté sur base de son activité. Une façon de contourner ce problème serait d'exprimer l'enzyme cible sous forme recombinante, ce qui nécessite de connaître les gènes codant pour ces enzymes, mais comme nous allons le voir ci-dessous, l'approche moléculaire appliquée à la synthèse de la paroi est très récente et peu de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse des polysaccharides matriciels ont été clonés.

2.3 L'approche moléculaire de la biosynthèse de la paroi cellulaire végétale

A l'heure actuelle, le nombre d'enzymes impliquées dans la biosynthèse de la paroi cellulaire végétale dont le gène correspondant a pu être cloné est encore relativement peu élevé. Des approches telles que la génomique (analyse de séquence) et la biochimie (étude des activités des protéines obtenues par expression des gènes clonés) sont mises en application

pour identifier et caractériser ces gènes. Jusqu'à présent, seuls les gènes codant pour les enzymes suivantes ont été clonés : la sucrose synthase (Martin *et al.*, 1993), l'ADP-glucose pyrophosphorylase (Villand *et al.*, 1993), l'UDP-glucose déhydrogénase (Tenhaken et Thulke, 1996), l'UDP-glucose épimérase (Dörmann et Benning, 1996), la GDP-mannose déhydratase (Bonin *et al.*, 1997), la galactosyltransférase (Edwards *et al.*, 1999), la fucosyltransférase (Perrin *et al.*, 1999), et la GDP-mannose pyrophosphorylase (Keller *et al.*, 1999). Le clonage de ces enzymes a été effectué selon deux voies principales : a) par purification de l'enzyme, microséquençage de la protéine isolée sur gel SDS-PAGE, identification d'un EST (Expressed Sequence Tag) correspondant chez *Arabidopsis* et utilisation de cet EST pour l'isolement de clones à partir d'une banque d'ADNc d'*Arabidopsis* (c'est l'approche utilisée dans le cas de la fucosyltransférase, par exemple) ; b) par l'identification d'EST d'*Arabidopsis* homologues à des séquences correspondant à des enzymes bactériennes ou fongiques, et utilisation de ces EST pour l'isolement de clones à partir d'une banque d'ADNc d'*Arabidopsis* (c'est l'approche utilisée dans le cas de la glucose épimérase, par exemple). L'aboutissement il y a peu du séquençage du génome d'*Arabidopsis thaliana* (Eckardt, 2001 ; Bevan *et al.*, 2001), met à la disposition des chercheurs des quantités importantes d'informations qui vont certainement accélérer le processus d'identification des enzymes impliquées dans la synthèse de la paroi.

Cette connaissance progressive des voies de synthèse des polysaccharides pariétaux ouvrira de nouvelles perspectives particulièrement intéressantes tant du point de vue fondamental qu'appliqué. Ainsi, le clonage des gènes codant pour ces enzymes va faciliter le développement de nouvelles stratégies visant à modifier les propriétés de la paroi cellulaire végétale chez des plantes transgéniques (Chapple et Carpita, 1998) : les effets de la surexpression ou de l'extinction d'un gène donné pourront dès lors être directement étudiés dans le but d'obtenir des renseignements quant à la fonction de l'enzyme codée par ce gène, en observant les effets de ces modifications sur la paroi. Il est à noter qu'une stratégie «inverse» a déjà été mise en place. Des mutants d'*Arabidopsis thaliana* présentant une composition altérée de leurs parois ont été générés par mutagenèse chimique (Reiter *et al.*, 1997). Certains, dont le mutant *murl* déficient en fucose, ont permis l'identification et le clonage du gène codant pour la GDP-mannose déhydratase, enzyme qui catalyse la première étape de la synthèse du GDP-fucose (Bonin *et al.*, 1997).

Un autre intérêt, et non des moindres, de la maîtrise des voies de synthèse des polysaccharides de la paroi cellulaire végétale est la perspective de générer des polysaccharides sur demande, c'est-à-dire des polysaccharides répondant à des exigences définies pour l'industrie, l'agroalimentaire, la recherche, ... (<http://www.bch.msu.edu/faculty/kindel.htm> ; Yuan et Knauf, 1997 ; Chapple et Carpita, 1998). Dans un avenir proche, le contrôle des gènes de transférases impliqués dans la synthèse des pectines par exemple, permettra la production massive et dirigée de ces composants qui entrent dans la fabrication des agents gélifiants (Monnier, 1999).

L'aboutissement du séquençage du génome d'*Arabidopsis thaliana* génère un nouveau challenge : la détermination des activités biochimiques et des fonctions des produits des gènes identifiés (Keegstra, 2001). C'est d'ailleurs dans ce but qu'un Multinational coordinated *Arabidopsis* 2010 project a été récemment mis en place (<http://arabidopsis.org/workshop1.html>).

Dans ce contexte, l'intérêt grandissant pour la biosynthèse de la paroi a abouti à la mise en route d'un «Cell Wall Biosynthesis Network» début 2001, à l'initiative des Dr.K.Keegstra et N.Raikhel déjà impliqués dans l'étude de la synthèse des hémicelluloses, et de grands groupes de chercheurs américains. Le but d'un tel réseau est de permettre un maximum d'échanges d'informations en ce qui concerne les voies de synthèse des polymères pariétaux. Ces chercheurs insistent également sur la nécessité dans ce cadre d'étude de mettre en place une série d'outils expérimentaux tels que des substrats, permettant de suivre l'activité de l'enzyme isolée, et surtout des anticorps, permettant d'étudier la fonction des enzymes aux niveaux subcellulaire, cellulaire, des organes et de l'organisme entier (<http://www.msu.edu/keegstra.htm>, Keegstra *et al.*, 2000).

Conscient de la nécessité de développer de nouveaux outils pour de telles études, notre laboratoire s'est engagé, dès 1999, dans un projet de génération d'anticorps dirigés contre des enzymes impliquées dans la synthèse des polysaccharides pariétaux. C'est dans le cadre de ce projet que se situe ce mémoire visant à obtenir et caractériser des anticorps dirigés contre l'UDP-glucose déhydrogénase, enzyme que nous présentons ci-dessous.

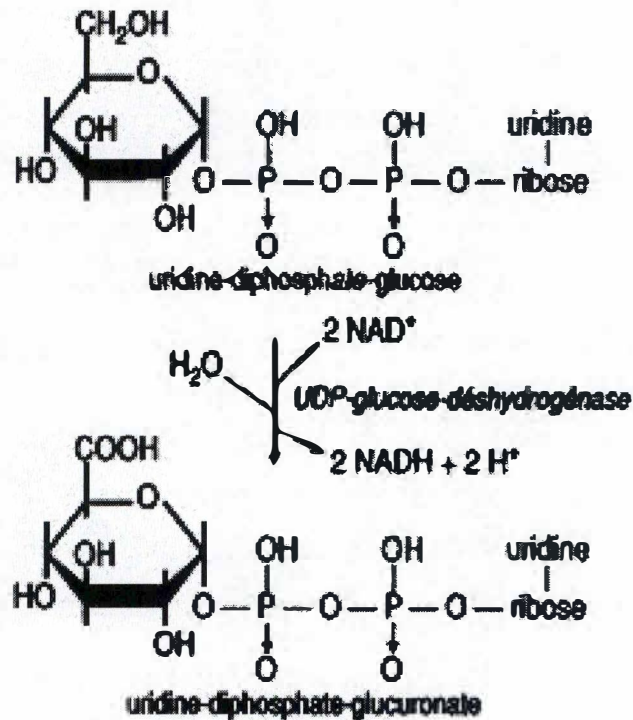


Figure 3 : Réaction catalysée par l'UDP-gldh : formation de l'UDP-acide glucuronique à partir d'UDP-glucose.

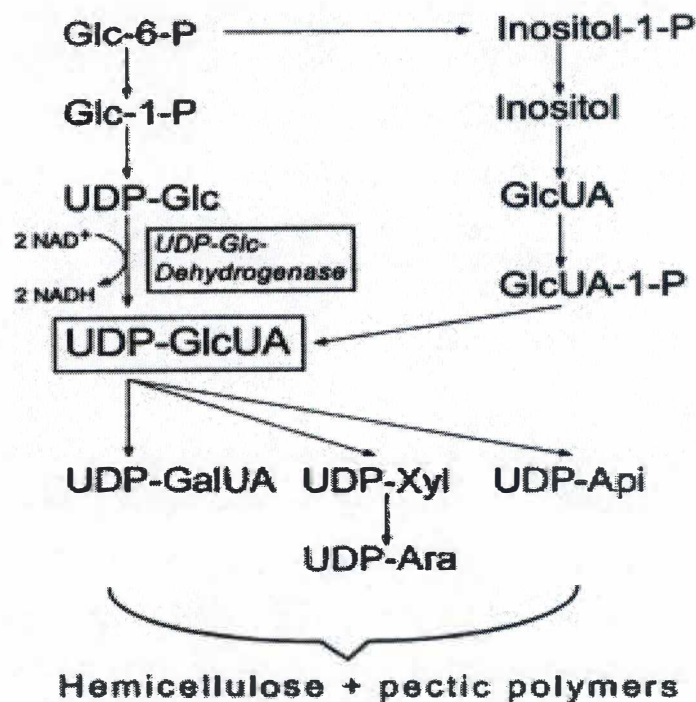


Figure 4 : Voie métabolique conduisant aux hémicelluloses et pectines via l'UDP-acide glucuronique provenant soit de la voie de l'oxydation des sucres nucléotides soit de la voie de l'oxydation du myo-inositol (d'après Tenhaken et Thulke, 1996).

3. L'URIDINE DIPHOSPHATE GLUCOSE DEHYDROGENASE

Nous allons aborder ici divers aspects de l'étude de l'UDP-glucose déhydrogénase notée dans la suite de ce travail UDP-gldh. Nous commencerons par une présentation générale de cette enzyme, suivie de commentaires plus spécifiques en ce qui concerne sa structure et sa fonction. La façon dont elle a été étudiée jusqu'à présent et les informations connues à son sujet seront explicitées également.

3.1 Présentation générale de l'UDP-gldh

L'UDP-gldh est une enzyme qui convertit l'UDP-glucose en UDP-acide glucuronique, selon la réaction suivante : $\text{UDP glucose} + 2 \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{UDP glucuronate} + 2 \text{NADH} + 2\text{H}^+$ (Figure 3). La voie métabolique dans laquelle cette enzyme intervient est la première étape d'une voie ramifiée conduisant aux hémicelluloses et aux pectines qui contiennent respectivement des acides glucuroniques ou galacturoniques, ainsi que du xylose, de l'arabinose et/ou de l'apiose (Figure 4).

Dans les parois des feuilles d'*Arabidopsis* $\pm 50\%$ de la masse cellulaire est produite à travers les précurseurs polysaccharidiques dérivés de l'UDP-acide glucuronique, démontrant l'importance de celui-ci dans la biosynthèse de la paroi cellulaire végétale (Seitz *et al.*, 2000).

3.2 Isolement et caractérisation d'UDP-gldh végétales

Peu de littérature est disponible en ce qui concerne cette enzyme chez les végétaux : seuls deux articles font état de l'isolement et de la caractérisation d'une UDP-gldh végétale (Robertson *et al.*, 1996 et Tenhaken *et al.*, 1996).

Robertson et ses collaborateurs ont utilisé une approche biochimique classique pour l'isolement d'UDP-gldh à partir de cellules en suspension de haricots verts (Robertson *et al.*, 1996). L'enzyme qu'ils ont obtenue a un poids moléculaire de 40 kDa et, assez paradoxalement, la séquence en acides aminés de deux peptides obtenus après digestion de la protéine présente un haut degré de similarité avec l'alcool déhydrogénase végétale. Cette enzyme montre de plus une activité de type ADH. Un anticorps a été produit contre l'enzyme purifiée et utilisé afin de localiser l'UDP-gldh dans des hypocotyles de haricots verts. Les

auteurs ont constaté la présence d'UDP-gldh dans le xylème et le phloème en développement et une absence marquée de l'enzyme dans le xylème mature, suggérant que l'UDP-gldh est exprimée durant les stades précoces de la différenciation vasculaire.

Par une approche moléculaire, Tenhaken et Thulke (1996) ont été les premiers à cloner un gène codant pour une UDP-gldh végétale. La séquence du gène isolé chez le soja (*Glycine max*) est fortement conservée entre diverses espèces de plantes (plus de 95% de conservation entre celle du soja et celle d'*Arabidopsis*) et est de façon surprenante homologue avec la séquence bovine (Hempel *et al.*, 1994) avec laquelle elle partage $\pm 70\%$ de similarité. Ce gène code pour une protéine de 480 acides aminés, de poids moléculaire attendu de 52,9 kDa. Cette séquence en acides aminés présente des motifs caractéristiques de l'UDP-gldh conservés aussi bien dans les séquences eucaryotiques que procaryotiques, à savoir : un centre catalytique, un site de liaison NAD, et deux résidus proline pour la courbure de la chaîne principale.

L'enzyme est fortement exprimée dans les jeunes racines mais présente une expression plus faible dans les tissus de l'épicotyle et dans les jeunes feuilles. Un polysérum a été produit contre la protéine exprimée en *E. coli* sous forme recombinante. Ce sérum reconnaît une protéine de 52 kDa dans des extraits de cellules en suspension de soja (Tenhaken et Thulke, 1996).

Dans leur article, Tenhaken et Thulke citent et critiquent sur divers points la parution antérieure de Robertson *et al.*, 1996, qui présente selon eux des résultats conflictuels à plusieurs niveaux. Ainsi la taille observée de l'UDP-gldh de soja est de 52 kDa, ce qui est identique à la taille de l'enzyme bovine, mais très différent d'une taille de 40 kDa observée chez le haricot par l'équipe de Robertson. Les plants de soja et de haricots étant relativement proches, il apparaît comme hautement improbable que la ou les protéines isolée(s) chez le haricot vert par Robertson soi(en)t de l'UDP-gldh. De plus, Robertson et ses collaborateurs, ont mis en avant la similarité de leur fraction enzymatique partiellement purifiée avec l'alcool déhydrogénase. Or la comparaison des masses moléculaires et des séquences en acides aminés de l'ADH d'*Arabidopsis* avec celles de l'UDP-gldh démontre une absence d'homologie manifeste entre l'UDP-gldh et l'ADH, à l'exception du site de liaison NAD, observé auparavant par Hempel (1994). Il semblerait donc que Robertson *et al.*, aient purifié de l'ADH plutôt que de l'UDP-gldh des plants de haricots.

3.3 Rôle régulateur de l'UDP-gldh dans la biosynthèse de la paroi.

Comme nous l'avons dit précédemment (cfr 2.2) le contrôle du pool des précurseurs, les sucres diphosphonucléosidiques, constitue un moyen pour la cellule végétale de réguler la synthèse de ses polysaccharides matriciels. Des études biochimiques ont ainsi suggéré que la production d'UDP-acide glucuronique constituerait l'étape limitante dans la fourniture des autres précurseurs (UDP-xylose, UDP-apiose, ...) indispensables à la formation de la paroi en croissance (Robertson *et al.*, 1996).

Par ailleurs le rôle central de l'UDP-gldh dans le contrôle de la synthèse de ces précurseurs a été mis en évidence par des études biochimiques qui ont montré que l'activité de cette enzyme était généralement nettement plus faible que celle des enzymes agissant en aval dans les voies métaboliques (Seitz *et al.*, 2000). Cette disponibilité des précurseurs serait également sous le contrôle d'une régulation fine à travers un feed-back négatif de l'UDP-gldh par le biais de l'UDP-xylose, ainsi que via une inhibition compétitive de l'enzyme par l'UDP-acide glucuronique (Smith, 1993).

L'analyse du rôle de l'UDP-gldh dans la biosynthèse de la paroi est rendue compliquée par l'existence d'une seconde voie de biosynthèse de l'acide glucuronique appelée voie de l'oxydation de l'inositol ou myo-inositol (Richter, 1993 ; Seitz *et al.*, 2000). Ainsi, chez diverses plantes, il n'est pas possible de démontrer l'activité de l'UDP-gldh alors que l'on peut mettre en évidence la présence de quantités considérables d'UDP-acide glucuronique. Ce dernier dérive en fait de l'inositol suite à l'action de toute une série d'enzymes (Figure 5).

Ces deux voies de synthèse de l'UDP-acide glucuronique semblent coexister au sein d'une même plante, en étant toutefois limitées à des organes et/ou tissus différents.

Des expériences faisant appel à des *Arabidopsis* transgéniques ont permis d'analyser de manière plus précise le pattern d'expression du gène de l'UDP-gldh (Seitz *et al.*, 2000). Ainsi, l'expression des gènes rapporteurs GUS (β glucuronidase) et GFP (Green Fluorescent Protein) sous le contrôle du promoteur de l'UDP-gldh a mis en évidence que le gène de

	IgG de mammifères	IgY de poule
Echantillon d'Ac (récolte)	invasif	non-invasif
Quantité d'Ac	200mg IgG par saignée (40ml de sang)	50-100mg par oeuf (5-7 œufs/semaine)
Quantité d'Ac/mois	200mg	+/- 1500mg
Quantité d'Ac spécifiques	+/- 5%	2-10%

Figure 6 : Caractéristiques des anticorps (Ac) obtenus chez les mammifères et les poules (<http://www.sph.jhu.edu>).

3.3 Rôle régulateur de l'UDP-gldh dans la biosynthèse de la paroi.

Comme nous l'avons dit précédemment (cfr 2.2) le contrôle du pool des précurseurs, les sucres diphosphonucléosidiques, constitue un moyen pour la cellule végétale de réguler la synthèse de ses polysaccharides matriciels. Des études biochimiques ont ainsi suggéré que la production d'UDP-acide glucuronique constituerait l'étape limitante dans la fourniture des autres précurseurs (UDP-xylose, UDP-apiose, ...) indispensables à la formation de la paroi en croissance (Robertson *et al.*, 1996).

Par ailleurs le rôle central de l'UDP-gldh dans le contrôle de la synthèse de ces précurseurs a été mis en évidence par des études biochimiques qui ont montré que l'activité de cette enzyme était généralement nettement plus faible que celle des enzymes agissant en aval dans les voies métaboliques (Seitz *et al.*, 2000). Cette disponibilité des précurseurs serait également sous le contrôle d'une régulation fine à travers un feed-back négatif de l'UDP-gldh par le biais de l'UDP-xylose, ainsi que via une inhibition compétitive de l'enzyme par l'UDP-acide glucuronique (Smith, 1993).

L'analyse du rôle de l'UDP-gldh dans la biosynthèse de la paroi est rendue compliquée par l'existence d'une seconde voie de biosynthèse de l'acide glucuronique appelée voie de l'oxydation de l'inositol ou myo-inositol (Richter, 1993 ; Seitz *et al.*, 2000). Ainsi, chez diverses plantes, il n'est pas possible de démontrer l'activité de l'UDP-gldh alors que l'on peut mettre en évidence la présence de quantités considérables d'UDP-acide glucuronique. Ce dernier dérive en fait de l'inositol suite à l'action de toute une série d'enzymes (Figure 5).

Ces deux voies de synthèse de l'UDP-acide glucuronique semblent coexister au sein d'une même plante, en étant toutefois limitées à des organes et/ou tissus différents.

Des expériences faisant appel à des *Arabidopsis* transgéniques ont permis d'analyser de manière plus précise le pattern d'expression du gène de l'UDP-gldh (Seitz *et al.*, 2000). Ainsi, l'expression des gènes rapporteurs GUS (β glucuronidase) et GFP (Green Fluorescent Protein) sous le contrôle du promoteur de l'UDP-gldh a mis en évidence que le gène de

l'UDP-gldh était exprimé préférentiellement dans les organes en croissance tels que les jeunes racines et les jeunes feuilles en expansion.

La quasi absence d'expression du gène dans les hypocotyles et les cotylédons de jeunes plantules serait due à la prépondérance de la voie de l'inositol pour la formation de l'UDP-acide glucuronique. Cette dernière nécessite en effet la présence d'oxygène (Figure 5) pour la synthèse d'acide glucuronique. Cet oxygène accessible pour les parties aériennes des plantules, y compris l'hypocotyle, permettrait à la voie de l'inositol de fonctionner, ce qui ne serait pas le cas dans les jeunes racines où la voie de l'UDP-gldh serait la seule utilisée (Seitz *et al.*, 2000). Néanmoins, la confirmation enzymatique directe du fonctionnement de la voie de l'inositol dans les hypocotyles et les cotylédons n'a pas été effectuée.

Une parfaite correspondance a été constatée entre, d'une part, les schémas d'expression des gènes rapporteurs et d'autre part, les schéma de détection histochimique de l'activité de l'UDP-gldh, ce qui indiquerait que l'enzyme serait régulée au niveau transcriptionnel (Seitz *et al.*, 2000). Aucun schéma de régulation n'a toutefois été avancé par ces auteurs.

Tous ces résultats suggèrent donc l'existence de deux voies de biosynthèse des précurseurs des polysaccharides matriciels chez *Arabidopsis* dont le fonctionnement, du moins chez les jeunes plantules, serait spécifique d'organes donnés.

4. LA PRODUCTION D'ANTICORPS CONTRE DES ENZYMES IMPLIQUEES DANS LA SYNTHÈSE DE LA PAROI

De par leur spécificité, les anticorps constituent des outils particulièrement utiles pour l'analyse des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la paroi. S'il existe déjà des anticorps contre certaines enzymes dont le gène correspondant a été cloné (exemples : la sucrose synthase (Buckeridge *et al.*, 1999) ; la fucosyltransférase (Perrin *et al.*, 1999)), ceux-ci sont utilisés en western-blot mais jamais pour la localisation des enzymes dans les tissus végétaux, ce qui se révélerait d'un grand intérêt afin de résoudre les ambiguïtés quant à leur localisation soit membranaire soit cytoplasmique comme nous l'avons vu précédemment . Il existe une demande certaine d'anticorps dans ce domaine. Preuve concrète de cet intérêt,

	IgG de mammifères	IgY de poule
Echantillon d'Ac (récolte)	invasif	non-invasif
Quantité d'Ac	200mg IgG par saignée (40ml de sang)	50-100mg par oeuf (5-7 œufs/semaine)
Quantité d'Ac/mois	200mg	+/- 1500mg
Quantité d'Ac spécifiques	+/- 5%	2-10%

Figure 6 : Caractéristiques des anticorps (Ac) obtenus chez les mammifères et les poules (<http://www.sph.jhu.edu>).

notre laboratoire a été récemment contacté par une équipe hollandaise pour la détection de glucose épimérase dans des extraits et des tissus de pommes de terre transgéniques.

Il existe deux façons de produire les protéines nécessaires pour l'immunisation des animaux : a) Soit on purifie l'enzyme cible à partir de tissus végétaux. Cette façon de procéder comporte des inconvénients tels que la nécessité de l'obtention d'une protéine très pure, et dont l'activité doit être évaluée par l'utilisation de substrats spécifiques, souvent difficiles à obtenir ; b) Soit on produit l'enzyme cible en bactérie, sous forme recombinante, en se servant des informations présentes dans les banques de données et en clonant le gène correspondant dans un vecteur bactérien.

C'est cette seconde stratégie que nous avons suivie jusqu'à présent dans le cadre du projet de recherche mené dans notre laboratoire. Malgré son efficacité, cette démarche présente le désavantage majeur de la contamination de la protéine recombinante cible par des protéines d'*E. coli*. Ces protéines contaminantes étant à l'origine d'une réponse non spécifique parfois importante du sérum il est donc nécessaire de procéder à une purification de ce dernier par épuisement, de manière à le rendre mono- spécifique.

L'alternative choisie dans le cadre de ce mémoire est d'immuniser l'animal avec des peptides choisis dans des zones conservées de la protéine cible. Outre le gain de temps escompté, cette approche peptidique aurait également l'avantage d'être plus «propre» par rapport à l'approche protéique classique. Nous avons choisi de comparer les réponses développées contre ces peptides chez deux espèces : le lapin et la poule. Cette dernière est connue comme une alternative prometteuse puisqu'elle permet théoriquement l'obtention d'une grande quantité d'anticorps (Lösch *et al.*, 1986) (Figure 6 ci-contre). De plus, la récupération des anticorps est nettement moins invasive par rapport à la procédure classique utilisée pour le lapin, étant donné qu'il suffit de récolter les œufs au lieu de procéder à un prélèvement de sang.

Ainsi, chaque œuf peut contenir typiquement approximativement de l'ordre de 90 à 100 mg d'Ig Y et les anticorps spécifiques sont souvent compris entre 1 – 10 % du total, c'est à dire que l'on peut obtenir des rendements de 1-10 mg d'Ig Y spécifiques par œuf, ce qui représente \pm l'équivalent de 20 saignées de lapin (<http://www.sph.jhu.edu>, <http://www.appliedbiosystems.com>).

5. BUT DU MEMOIRE

Comme nous l'avons dit précédemment, ce travail se situe dans le cadre général d'un projet de recherche visant à constituer un pool de sondes dirigées contre des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la paroi cellulaire végétale. Dans ce contexte, l'objectif de ce mémoire a été l'obtention et la caractérisation d'anticorps dirigés contre une de ces enzymes : l'UDP-glucose déhydrogénase, choisie pour son implication dans la formation des précurseurs indispensables pour la synthèse des polysaccharides matriciels de la paroi.

MATERIEL ET METHODES

1. SYNTHÈSE D'ADN COMPLÉMENTAIRE

Principe

Des ARN messagers purifiés à partir d'*Arabidopsis thaliana* ont directement servi de matrice pour la synthèse des ADN complémentaires (ADNc). Les quantités d'ADNc étant trop faibles pour être visualisables par électrophorèse sur gel d'agarose, le succès de cette étape est vérifié par une utilisation de ces ADNc comme matrice dans des réactions PCR d'amplification des gènes codant pour les protéines d'intérêt.

Matériel

Kit First strand cDNA synthesis (Amersham-Pharmacia-Biotech)

Protocole

Nous avons choisi de réaliser la synthèse des ADNc dans un volume final de 15 µl en suivant les instructions fournies avec le kit. Le travail avec de l'ARN est réalisé en condition RNAase free afin de ne pas dégrader celui-ci. On prend donc la précaution de porter des gants, de travailler avec des embouts stériles, et avec de l'H₂O-DEPC fournie dans le kit. De plus, tous les réactifs ont été maintenus sur glace.

1. Préparer le mélange suivant : x µl d'ARNm (correspondant à une quantité comprise entre 20 et 100 ng) et y µl d'H₂O-DEPC pour atteindre un volume de 8 µl

Nous avons utilisé pour cette réaction 57,5 ng d'ARNm purifiés d'*Arabidopsis thaliana*, conservés à -70°C.

2. Incuber à 65°C pendant 10 minutes et mettre immédiatement sur glace. Centrifuger à 13000 rpm pendant quelques secondes (à 4°C).

3. Ajouter aux 8 µl : 5 µl de first strand mix, 1 µl de DTT (200 mM), 1 µl de Not primer (5µg/µl)(dilué 25 fois avec H₂O-DEPC) pour un volume final de 15 µl

4. Mélanger par pipettage et centrifuger à 13000 rpm pendant quelques secondes.

5. Incuber à 37°C pendant une heure et stocker ensuite à -20°C.

2. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Matériel

Taq polymérase, dNTP, Tampon PCR (Roche)

Appareil PCR : minicycler TM ou PTC –100 Programmable Thermal Controller (MJ Research Biozym)

Tubes 0,2 ml

Amorces :

-FOR et REV spécifiques de l'UDP-gldh, dont les séquences sont présentées et localisées dans les Résultats à la Figure 10.

Forward UDP-gldh : 5' ACGTGAATTCATGGTGAAGATATGTTGT 3' (site EcoRI)

Reverse UDP-gldh : 5' ACGTGCGGCCGCTTAGGCCDABGGCAGGCAT 3 (site NotI)

Code de dégénérescence : D = (A, T, G) , B = (G, C, T)

-Amorces universelles M13 Forward et M13 Reverse

-Amorces universelles T7 promoteur et T7 terminateur

Ces amorces ont été synthétisées par Eurogentec (Seraing, Belgique). Les amorces lyophilisées sont resuspendues dans de l'eau afin d'obtenir une solution stock de 100 picomoles/ μ l. Elles sont conservées à -20°C .

Protocoles

2.1 Amplification du gène de l'UDP-gldh à partir d'ADNc

**Préparer le mélange suivant :*

5 μ l d'ADNc

0,5 μ l d'amorce FOR UDP-gldh(10pmol/ μ l)

0,5 μ l d'amorce REV UDP-gldh (10pmol/ μ l)

5 μ l de tampon PCR (react buffer 10x)

2 μ l de dNTP mix (10 mM)

0,5 μ l de Taq polymérase (5 U/ μ l) (Roche)

Compléter à 50 μ l avec d'eau stérile. Vortexer et centrifuger le mélange avant de le mettre dans l'appareil. L'effet d'un excès de MgCl_2 sur l'amplification PCR a également été testé en ajoutant 1,25 μ l de MgCl_2 50 mM au mélange PCR ci-dessus.

**Cycle d'amplification*

30 cycles : dénaturation 1 minute à 94°C ; hybridation 1 minute à 57°C ; élongation 3 minutes à 72°C. On termine par 10 minutes à 72°C avant le retour à 4°C. On vérifie l'amplification en déposant 1/10 du volume du produit PCR (5µl) + 2 µl de tampon de chargement sur gel d'agarose.

2.2 Amplification des inserts clonés dans pCRII (PCR sur colonies).

**Préparer le mélange suivant :*

Une colonie issue de l'étalement de bactéries transformées avec le produit de ligation pCRII-UDP-gldh (Sous hotte, piquer dans une colonie avec un embout de pipette et plonger celui-ci dans un tube contenant le mélange PCR. Disperser les bactéries dans la solution par aspiration-refoulement.).

1 µl d'amorce M13 Forward (10pmol/µl)

1 µl d'amorce M13 Reverse (10pmol/µl)

5 µl de tampon PCR (react buffer 10x)

2 µl de dNTP mix (10 mM)

0,5 µl de Taq polymérase (5 U/µl)

Compléter à 50 µl avec de l'eau stérile. Vortexer et centrifuger le mélange avant de le mettre dans l'appareil.

**Cycles d'amplification*

30 cycles : dénaturation 1 minute à 94°C ; hybridation 1 minute à 55°C ; élongation 3 minutes à 72°C. On termine par 10 minutes à 72°C avant le retour à 4°C.

Déposer 1/10 du volume du produit PCR (5µl) + 2 µl de tampon de chargement sur gel d'agarose.

2.3 Amplification des inserts clonés dans pET 17b (PCR sur colonies)

**Préparer le mélange suivant :*

Une colonie issue de l'étalement de bactéries transformées avec le produit de ligation pET17b-UDP-gldh (Sous hotte, piquer dans une colonie avec un embout de pipette et plonger celui-ci dans un tube contenant le mélange PCR. Disperser les bactéries dans la solution par aspiration-refoulement).

1 µl d'amorce T7 promoteur (10pmol/µl)

1 µl d'amorce T7 terminateur (10pmol/µl)

5 µl de tampon PCR (react buffer 10x)

2 µl de dNTP mix (10 mM)

0,5 µl de Taq polymérase (5 U/µl)

Compléter à 50 µl avec de l'eau stérile. Vortexer et centrifuger le mélange avant de le mettre dans l'appareil.

**Cycles d'amplification*

Trente cycles : dénaturation 1 minute à 94°C ; hybridation 1 minute à 50°C ; élongation 3 minutes à 72°C. On termine par 10 minutes à 72°C avant le retour à 4°C.

Déposer 1/10 du volume du produit PCR (5µl) + 2 µl de tampon de chargement sur gel d'agarose.

3. SEQUENCAGE DU GENE CLONE DANS LE VECTEUR pCRII

Matériel

Taq polymérase, dNTP, Tampon PCR (Roche)

Appareil PCR : minicycler TM ou PTC -100 Programable Thermal Controler (MJ Research Biozym)

Tubes Eppendorf 0,2 ml

Colonnes Microcon YM-100, Amicon

Amorces universelles M13 Forward (FOR) et M13 Reverse (REV)

Les amorces internes de l'UDP-gldh, localisées à la Figure 10 :

1^{ère} série

Int. 2 (Forward) : 5' CAACACACCGACTAAGAC 3'

Int. 1 (Reverse) : 5' GTCTTAGTCGGTGTGTTG 3'

Int. 4 (Forward) : 5' GACCATCCTCTACATTTG 3'

Int. 3 (Reverse) : 5' CAAATGTAGAGGATGGTC 3'

2^{ème} série

Forward 1.2 : 5' CGCATTCAAGAAAGACAC 3'

Reverse 1.1 : GTGTCTTTCTTGAATGCG 3'

Forward 1.4 : 5' GCAGATGTCACGCAAGT 3'

Reverse 1.3 : 5' ACTTGCGTGACATCTGC 3'

Protocoles

3.1 PCR de préséquençage

Préparer le mélange suivant :

1 µl d'ADN plasmidique UDP-gldh-pCRII

1 µl d'amorce M13 Forward (10pmol/µl)

1 µl d'amorce M13 Reverse (10pmol/µl)

5 µl de tampon PCR (react buffer 10x)

2 µl de dNTP mix (10 mM)

0,5 µl de Taq polymérase (5 U/µl)

Compléter à 50 µl avec de l'eau stérile. Vortexer et centrifuger le mélange avant de le mettre dans l'appareil.

3.2 Purification des produits PCR

1. Mélanger 400 µl d'eau et les 45 µl du produit PCR dans un eppendorf (5µl des 50 µl de produit PCR ont été déposés sur gel d'agarose de vérification).

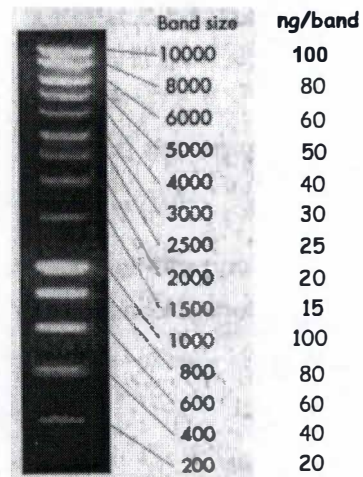
2. Déposer ce mélange sur une colonne Microcon placée dans un tube eppendorf et centrifuger à 7000 rpm pendant 15 minutes à T° ambiante.

3. Retourner la colonne et la placer dans un nouveau tube eppendorf. Déposer 20 µl d'eau au centre de la colonne et centrifuger à 4000 rpm durant 15 minutes.

4. Conserver à -20°C.

3.3 Quantification sur gel d'agarose du produit PCR purifié voir point 4.

Smart Ladder



Etalon de poids moléculaire utilisé comme standard lors de l'analyse des ADN en gel d'agarose

3.4 Préparation des échantillons à envoyer au séquençage

Mettre 0,5 µl d'ADN purifié dans un tube eppendorf, y ajouter 7,2 pmoles d'amorce et compléter à 12 µl avec de l'H₂O. Garder le mélange à -20°C. La réaction de séquençage proprement dite, ainsi que les opérations ultérieures, sont réalisées par le laboratoire de Physiologie et Physiopathologie. Le séquenceur automatique utilisé est le 377 DNA sequencer ABI Prism (Applied Biosystem).

4. GELS D'AGAROSE ET DEPOT DES ECHANTILLONS.

Principe

L'électrophorèse en gel d'agarose permet la séparation de fragments d'ADN en fonction de leur taille. L'ADN est détecté sur le gel grâce à la présence de bromure d'éthidium qui vient s'intercaler entre les deux brins d'ADN et rendu visible sous les UV (via un transilluminateur). L'estimation de la taille de l'échantillon déposé est rendue possible par la présence d'un étalon de poids moléculaire.

Matériel

Agarose (Multipurpose, Roche); Bromure d'éthidium; Tampon de chargement: glucose 40% et bleu de bromophénol 0,0025% en H₂O.

Echelle de poids moléculaire Smart ladder (Eurogentec, MW-1700-02), dont la composition est illustrée ci-contre.

Tampon TAE : Tris - acetate de sodium 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.

Cuve d'électrophorèse : LKB GNA 100 – electrophoresis system avec supports et peignes appropriés (Pharmacia Biotech); Source de courant : Electrophoresis power supply E425 (Consort); Transilluminateur (Applitek Scientific Instrument), Caméra (Sony, CDD-IRIS), Camera adaptor (Sony, YS-W130P), Video graphic printer (Sony, UP-860CE), High density paper (Sony, UPP-110 DH).

Protocoles

4.1 Gel analytique

1. Préparer 50 ml d'une solution d'agarose en concentration appropriée en tampon TAE (lors de ce mémoire tous les gels réalisés contenait 1% d'agarose). Chauffer au micro-onde jusqu'à dissolution totale de l'agarose.
2. Laisser refroidir jusqu'à environ 50°C, transférer dans un tube Falcon de 50 ml, ajouter 2 µl de solution de bromure d'éthidium préparé à 10 mg/ml d'eau et couler directement la solution sur un support approprié. Laisser refroidir \pm 30minutes.
3. Déposer le gel dans une cuve d'électrophorèse contenant le tampon TAE. Enlever les peignes et déposer les échantillons d'ADN en y ajoutant 1/5 de volume de tampon de chargement. Pour chaque migration, un étalon de poids moléculaire (Smart ladder), est déposé dans un des puits du gel, à raison de 5 µl. Effectuer les migrations pendant environ 45 min à 80 mA.
4. Visualiser les bandes sur un transilluminateur UV et prendre une photo.

4.2. Gel préparatif

Procéder de manière identique à celle décrite dans le cas des gels analytiques sauf : ajouter 1µl de bromure d'éthidium au lieu de 2 µl à la solution d'agarose, et procéder au préalable à la décontamination d'une cuve, d'un support et de peignes par pré-incubation de tout ce matériel durant une nuit dans de l'HCl 0,25 M. Après la migration des échantillons, prélever les bandes d'intérêt à l'aide d'un scalpel en veillant à prendre le moins d'agarose possible et les transférer dans des tubes Eppendorf en vue de leur purification (voir plus loin).

4.3. Gel de quantification

Procéder de manière identique à celle décrite dans le cas des gels analytiques. Déposer sur gel des solutions contenant respectivement 0,5 µl, 1 µl et 2 µl d'échantillon à quantifier additionné de 1 µl de tampon de chargement et de TE (Tris 10 mM et EDTA 1mM, pH 8) jusqu'à un volume final de 5 µl. La quantité d'ADN déposé est estimée par comparaison avec le Smart ladder, marqueur de poids moléculaire quantitatif (voir plus haut).

QIAEX II Gel Extraction Procedure

**Solubilized gel slice
+ QIAEX II particles**



Bind



Collect



Wash



Elute



Pure DNA Fragment

Principe de l'extraction-purification d'ADN découpé de gel d'agarose via le kit "QIAEX II agarose gel extraction".

5. EXTRACTION-PURIFICATION D'ADN DECOUPE DU GEL D'AGAROSE.

Principe

Nous avons utilisé pour ce faire le kit QIAEX II dont le principe est illustré ci-contre. L'agarose contenant l'ADN à purifier est dissous en présence des sels chaotropiques (tampon QXI). L'ADN est adsorbé sur des particules de silice en présence de fortes concentrations en sels. Après lavage, il est élué en présence d'une solution de faible force ionique.

Matériel

Kit « QIAEX II agarose gel extraction »(Quiagen)

Tampon TE : Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH8.

Centrifugeuse : Biofuge 13 (Heraeus sepatech).

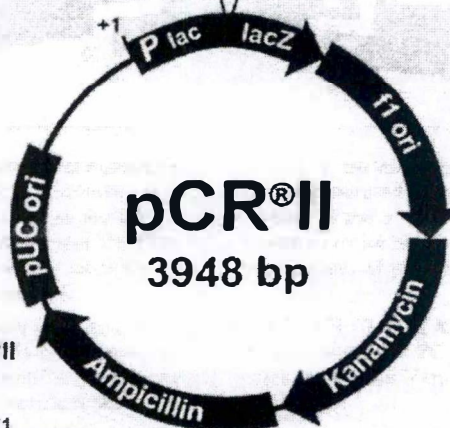
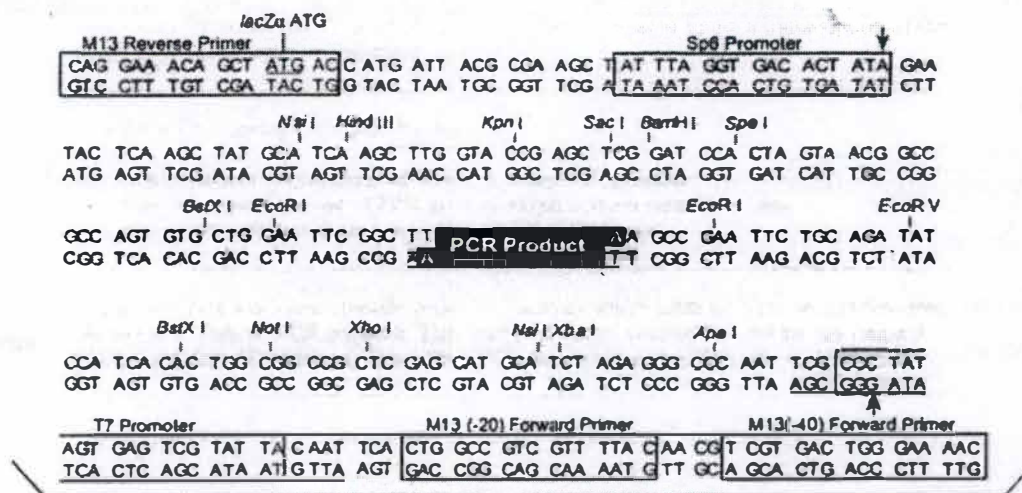
Bain à 50°C.

Protocole

Nous avons suivi les indications fournies avec le kit :

1. Peser le morceau d'agarose contenant l'ADN à purifier et y ajouter 3 volumes de tampon QX 1 (fragments d'ADN à purifier de 100 pb à 4 kb).
2. Resuspendre la résine QIAEX II en vortexant pendant 30 secondes et ajouter 10 µl de cette résine à l'échantillon (quantité d'ADN à purifier <2µg). Mélanger et incubé à 50°C pendant 10 minutes. Mélanger toutes les 2 minutes pour garder la résine en suspension.
3. Centrifuger l'échantillon pendant une minute et enlever le surnageant à la pipette.
4. Laver la résine en la mettant en suspension dans 500 µl de tampon QX1. Vortexer et centrifuger l'échantillon à 13000 rpm pendant une minute. Eliminer toute trace de surnageant avec une pipette.
5. Laver deux fois la résine avec 500 µl de tampon PE comme précédemment. Sécher le culot pendant 10 à 15 minutes à l'air libre.
6. Pour éluer l'ADN, ajouter 10 µl de Tris 10 mM pH 8,5 et resuspendre la résine en vortexant. Incuber à 50°C pendant 5 minutes. Centrifuger pendant une minute à 13000 rpm. Récolter le surnageant qui contient l'ADN élué dans un tube Eppendorf. Refaire l'opération et rassembler les deux éluats. Stocker à -20°C

Remarque : la composition des tampons QX 1 et PE ne sont pas données dans le kit.

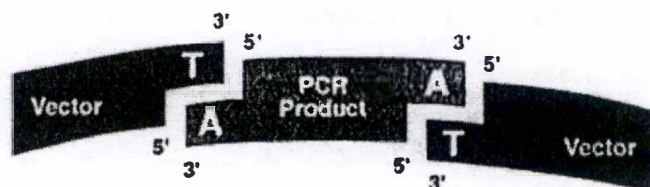


Comments for pCR®II
3948 nucleotides

LacZ gene: bases 1-571
 Sp6 promoter: bases 239-255
 Multiple Cloning Site: bases 269-381
 TA Cloning® site: bases 335-336
 T7 promoter: bases 388-407
 F1 origin: bases 572-986
 Kanamycin resistance: bases 987-2114
 Ampicillin resistance: bases 2133-2992
 pUC origin (pMB1-derived): bases 3182-3765

Figure 7 : Représentation du vecteur pCRII, adapté pour le clonage des produits PCR amplifiés par la Taq polymérase

The diagram below shows the concept behind the TA Cloning® method.



6. LIGATION

Principe de la ligation dans pCRII

Le vecteur pCRII, dont la carte est présentée à la Figure 7, est utilisé pour le clonage de produits PCR amplifiés par la Taq polymérase. Le principe du clonage de type TA réside dans la reconnaissance et l'appariement des déoxythymidine (T) des extrémités du vecteur linéarisé et des déoxyadénosine de l'insert (A). En effet, le vecteur est commercialisé sous forme linéaire avec, à ses deux extrémités, la présence de déoxythymidine (T) protrudantes, tandis que l'insert obtenu par PCR comporte à ses deux extrémités une déoxyadénosine (A) protrudante ajoutée par la Taq polymérase.

Matériel

Kit PCRII (Invitrogen)

Protocole

1. Réaliser sur glace le mélange suivant :

1 µl de tampon de ligation (10 fois concentré)

2 µl de vecteur (50 ng)

x µl d'insert (correspondant à x ng et calculé par la formule ci-dessous)

1 µl de T4 DNA ligase (4U/µl)

y µl d'eau distillée pour atteindre 10 µl.

2. Mélanger délicatement le mélange de ligation et incubé à 14°C pendant une nuit.

Remarque : les rapports vecteur/insert utilisés dans le cadre de ce mémoire étaient de 1/1, 1/2, 1/2,5 et 1/3 suivant la quantité d'insert disponible. Dans le cas d'un rapport 1/1 la quantité d'insert à introduire dans la réaction de ligation est donnée par la formule suivante :

$$\frac{\text{taille de l'insert (pb)} \times \text{quantité de vecteur (ng)}}{\text{taille du vecteur (pb)}} = \text{ng d'insert}$$

En général, la quantité de vecteur utilisé est de 50 ng. Pour la ligation dans pCRII, nous avons utilisé 18,25 ng d'insert.

pET-17b expression landmarks	
T7 promoter	333-349
T7 transcription start	332
T7 Tag coding sequence	237-268
Multiplic cloning sites	
(Hind III - Xba I)	141-228
T7 terminator	28-74
pBR322 origin	1480
bla coding sequence	2241-3096

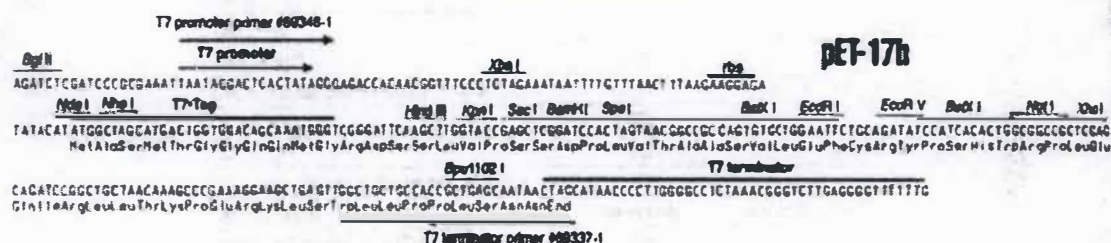
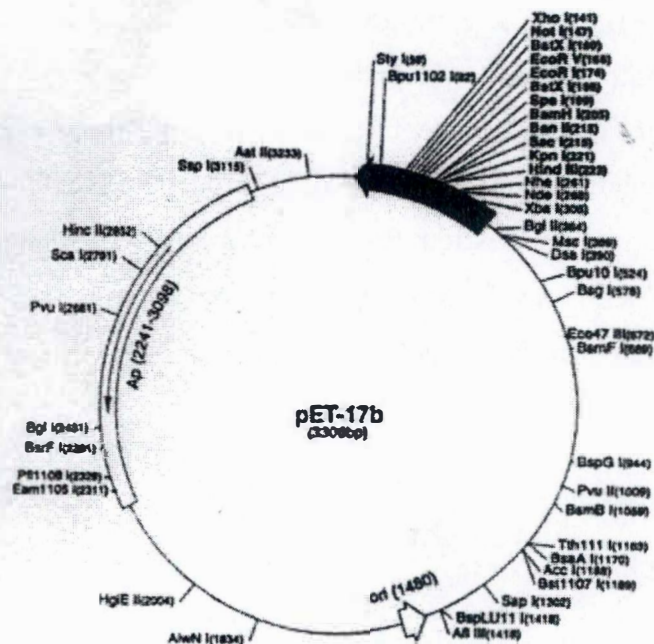


Figure 8 : Représentation du vecteur d'expression bactérien pET 17b

Vecteur pET17b

Le vecteur pET17b est un vecteur d'expression bactérien dont la carte est présentée ci-contre (Figure 8). Le principe de l'expression dans les vecteurs pET est présenté dans la partie Résultats.

Protocole

La procédure de ligation est identique à celle explicitée précédemment pour pCRII, mis à part l'utilisation de la T4 DNA ligase vendue par Gibco (1U/ μ l).

7. TRANSFORMATION DES BACTERIES CHIMIOCOMPETENTES

Principe

La transformation de bactéries se base sur un choc thermique qui a pour but de déstabiliser la membrane et faciliter de cette façon l'entrée d'une molécule d'ADN exogène dans la bactérie. Dans le cas de la transformation avec le vecteur pCRII, la sélection des recombinants (bactéries transformées par un plasmide contenant l'insert d'intérêt) s'effectue à l'aide du test blanc-bleu.

Matériel

Kit « One Shot-bactérie TOP 10 », BL21DE3 et BL21DE3 star (Invitrogen)

LB, pour 100 ml : 1 g de Bactotryptone, 0,5 g de Yeast extract, 1 g de NaCl, (pH7,5) + 1,5 g de Bactiagar. Ce milieu est autoclavé et refroidi dans un bain à 50°C durant 30 minutes et de l'ampicilline y est ajoutée à une concentration finale de 100 μ g/ml.

X-gal (20 mg/ml en N-diméthylformamide), IPTG (20 mg/ml en H₂O)

Protocoles

7.1 Transformation de bactéries TOP10 avec pCRII-UDP-gldh ou pET17b-UDP-gldh

Nous avons suivi les instructions fournies avec le kit en procédant comme suit :

1. Sortir les bactéries compétentes conservées à -70°C et les placer sur glace. Lorsqu'elles sont décongelées, ajouter 2 μ l du mélange de ligation pour 20 μ l de bactéries. Mélanger délicatement, et incuber les bactéries pendant 30 minutes dans la glace.
2. Placer ensuite les bactéries pendant 30 secondes dans un bain thermostaté à 42°C, les transférer ensuite sur glace et les y laisser 2 minutes.
3. Ajouter 250 μ l de milieu SOC fourni dans le kit (maintenu à 37°C) et incuber les bactéries à 37°C durant une heure sous agitation (étuve) à 220 rpm.

4. Etaler sur milieu sélectif adéquat 30 μ l de bactéries (boîtes 1/10) et 30 μ l résultant de la centrifugation à 2500 rpm pendant 2 minutes des 270 μ l restants (boîtes 9/10). Les bactéries transformées sont étalées sur le milieu sélectif LB-Ampicilline contenant l'antibiotique à une concentration finale de 100 μ g/ml et sur lequel on a étalé 35 μ l d'IPTG (20 mg/ml d' H_2O) et 35 μ l d'X-gal (20mg/ml en N-diméthylformamide). Incuber au moins une nuit à 37°C jusqu'à apparition des colonies.

7.2 Transformation de bactéries BL21DE3

1. Sortir les bactéries compétentes conservées à -70°C et les placer dans la glace.
2. Lorsque les bactéries sont décongelées, ajouter 1 μ l d'ADN plasmidique du vecteur recombinant pET17b-UDP-gldh ou bien 1 μ l de vecteur pET 17b sans insert aux 20 μ l de bactéries. Mélanger délicatement au moyen d'une pipette et incuber les bactéries pendant cinq minutes dans la glace.
3. Incuber ensuite les bactéries pendant 30 secondes dans un bain thermostatisé à 42°C.
4. Sortir rapidement les bactéries du bain à 42°C et les incuber dans la glace pendant 2 minutes.
5. Ajouter 80 μ l de SOC (maintenu à 37°C) et incuber les bactéries à 37°C durant 30 minutes sous agitation à 220 rpm.
6. Etaler respectivement 25 μ l (boîte 1/4) et 75 μ l (boîte 3/4) de la suspension bactérienne sur milieu LB contenant de l'ampicilline à une concentration finale de 100 μ g/ml. Incuber au moins une nuit à 37°C jusqu'à apparition des colonies.

7.3 Transformation des bactéries BL21DE3 star

1. Sortir les bactéries compétentes conservées à -70°C et les placer dans la glace.
2. Ajouter aux bactéries décongelées 1 μ l d'ADN plasmidique du vecteur recombinant pET17b-UDP-gldh ou bien 1 μ l de vecteur sans insert (pET 17b à 0,51 μ g/ μ l).
3. Incuber dans la glace durant 30 minutes, et ensuite dans un bain thermostatisé à 42°C durant 30 secondes.
4. Sortir rapidement les bactéries du bain à 42°C et les incuber dans la glace pendant 2 minutes.
5. Ajouter 250 μ l de SOC (maintenu à 37°C) et incuber sous agitation (220 rpm) 1 heure à 37°C.

6. Etaler sur des boîtes de LB contenant de l'ampicilline à une concentration finale de 100 µg/ml, respectivement 1/10 et 9/10 du mélange obtenu.
7. Incuber ensuite ces boîtes dans une étuve à 37°C durant au moins une nuit jusqu'à apparition des colonies.

8. PREPARATION D'ADN PLASMIDIQUE OU MINIPREP

Matériel

Milieu LB, pour 100 ml : 1 g de Bactotryptone, 0,5 g de Yeast extract, 1 g de NaCl, pH7,5,

Ampicilline, solution stock 20mg/ml d'eau, conservée à -20°C

Solution GTE (conservation à 4°C) : 50 mM glucose, 25 mM Tris.HCl (pH 8) et 10 mM EDTA (pH 8).

Solution NaOH-SDS : 0,2 M NaOH et 1% SDS.

Solution KAc : 60 ml d'acétate de potassium 5M, 11.5 ml d'acide acétique, 28.5 ml d'H₂O.

PCI : Phenol : Chlorophorme : Alcool Isoamylique (25 : 24 :1) (Sigma)

Tampon TE : Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8

Tampon TE-RNAase: tampon TE contenant 20 µg/ml de RNAase DNAase free

Protocole

1. Ensemencer 5 ml de milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline avec une colonie bactérienne. Laisser pousser une nuit à 37°C sous agitation (~ 250 rpm).
2. Transférer 1,5 ml de cette culture de nuit dans un tube Eppendorf. Centrifuger 3 minutes à 12000 rpm à 4°C (stocker le reste de la culture à 4°C).
3. Enlever le surnageant (faire attention à tout enlever) et remettre le culot en suspension dans 100 µl de solution GTE froide en vortexant vigoureusement. Incuber dans la glace pendant 5 minutes.
4. Ajouter 200 µl de solution NaOH-SDS fraîchement préparée et mélanger par inversion du tube plusieurs fois. Ne pas vortexer et stocker le tube dans la glace pendant 5 minutes.
5. Ajouter 150 µl de solution KAc et mélanger par inversion du tube plusieurs fois. Laisser les tubes sur glace 5 min.
6. Centrifuger à 12 000 rpm pendant 5 min à 4°C et transférer le surnageant dans un nouveau tube.
7. Ajouter un même volume de PCI, vortexer et centrifuger à 12 000 rpm pendant 5 min. à température ambiante.

8. Prélever le surnageant et précipiter l'ADN plasmidique avec deux volumes d'éthanol 96 % à température ambiante. Vortexer et laisser 2 min à température ambiante.
9. Centrifuger à 12 000 rpm pendant 5 min à 4°C. Enlever le surnageant. Laver le culot avec 1 ml d'éthanol 70% froid . Ne pas vortexer et centrifuger à 12 000 rpm pendant 5 min à 4°C.
10. Enlever le surnageant et sécher le culot au speed-vac pendant 5 minutes.
11. Dissoudre le culot dans 50 µl de tampon TE-RNAase, incubé 1h à 37°C et vortexer régulièrement pour aider à la dissolution. Stocker à -20°C.

9. RESTRICTION

Matériel

Enzymes : EcoRI (New England Biolabs 20 U/µl), NotI (New England Biolabs 10 U/µl)

Tampon 3 concentré 10x (New England Biolabs) + BSA (100µg/ml)

Protocole

Préparer le mélange suivant sur glace :

5 µl d'ADN plasmidique pCRII-UDP-gldh ou pET17b-UDP-gldh

0,2 µl de BSA

2 µl de tampon de réaction 3 (concentré 10 x)

12 µl d'H₂O

1 µl d'EcoRI ou NotI

soit un volume final de 20 µl

Vortexer et incubé 2 heures à 37°C.

Lors de la restriction sur le vecteur pET 17b seul (vecteur pET ultrapur Novagen à 0,51 µg/µl), on utilise 2 µl de vecteur pET17b, 2 µl de tampon, 14µl d'H₂O, 1 µl EcoRI et 1 µl NotI. Si les restrictions sont réalisées avec EcoRI et NotI ensemble, faire le mélange suivant :

5 µl d'ADN plasmidique

0,4 µl de BSA

4 µl de tampon 3 (concentré 10x)

1 µl d'EcoRI

1 µl de NotI

29 µl d'H₂O

soit un volume final de 40 µl

10. CULTURES BACTERIENNES

Matériel

LB, pour 100 ml: 1g de Bactotryptone, 0,5g de Yeast extract, 1 g de NaCl, pH 7,5

Ampicilline, solution stock 20mg/ml H₂O, conservée à -20°C

IPTG : Isopropyl-β-thiogalactoside , solution stock 1M en H₂O, conservée à - 20°C

Protocoles

10.1 Petite culture de 5ml

1. Ensemencer 5 ml de milieu LB additionné de 100 µg/ml d'ampicilline avec une colonie de bactéries BL21DE3 contenant le vecteur pET 17bUDP-gldh ou le vecteur pET 17b sans insert. Cultiver à 37°C sous agitation à 250 rpm.
2. Lorsque la DO_{600nm} de la suspension bactérienne est comprise entre 0,4 et 0,6 (après ± 2 heures d'incubation), ajouter l'IPTG à une concentration finale de 1 mM.
3. Après 3 heures de culture à 37°C sous agitation, prélever 500 µl de la culture bactérienne pour procéder par la suite à l'extraction des protéines.

10.2 Petite culture en vue d'une cinétique d'induction

1. Ensemencer 6 ml de LB additionné de 100 µg/ml d'ampicilline avec une colonie de bactéries BL21DE3 contenant le vecteur pET17b-UDP-gldh ou le vecteur pET17b sans insert. Incuber à 37°C sous agitation à 250 rpm.
2. Lorsque la DO_{600nm} de la culture bactérienne est comprise entre 0,4 et 0,6 (± 2 heures de culture) scinder chaque culture en deux, et ajouter de l'IPTG à une concentration finale de 1mM dans un des deux lots. Poursuivre les cultures à 37°C sous agitation.
3. Prélever 500µl de chacune des cultures bactériennes en vue de l'extraction des protéines respectivement 1h, 2h, 3h, et une nuit après l'induction de l'expression de la protéine cible par l'IPTG.

10.3 Grande culture en vue de la constitution d'un stock de la protéine d'intérêt

1. Faire une pré-culture par ensemencement de 100 ml de LB additionné de 100 µg/ml d'ampicilline avec une colonie de bactéries BL21DE3 contenant le vecteur pET 17b-UDP-gldh. Incuber à 37°C une nuit sous agitation à 250 rpm.
2. Ensemencer un litre de LB additionné de 100 µg/ml d'ampicilline avec les 100 ml de la pré-culture et incuber à 37°C sous agitation.
3. Lorsque la DO_{600nm} de la culture bactérienne est comprise entre 0,4 et 0,6, ajouter l'IPTG à une concentration finale de 1 mM.
4. Après 3h de culture à 37°C sous agitation, collecter les cellules par centrifugation en vue de l'extraction des protéines.

10.4 Culture en vue de l'isolement de la protéine d'intérêt par le «T7-Tag affinity purification kit»

1. Faire une pré-culture par ensemencement de 6 ml de LB additionné de 100 µg/ml d'ampicilline avec une colonie de bactéries BL21DE3 contenant le vecteur pET17b-UDP-gldh. Incuber à 37°C sous agitation.
2. Lorsque la DO_{600nm} de la culture bactérienne est comprise entre 0,6 et 1, la transférer à 4°C.
3. Le lendemain, centrifuger la culture liquide à 4000 rpm à 4°C pendant 10 minutes, éliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 4 ml de milieu LB.
4. Ensemencer 100 ml de LB additionné de 100 µg/ml d'ampicilline avec ces 4 ml de pré-culture et incuber à 37°C sous agitation.
5. Lorsque la DO_{600nm} de la culture bactérienne est comprise entre 0,4 et 0,6, ajouter l'IPTG à une concentration finale de 1 mM.
6. Incuber la culture à 37°C pendant 3 heures sous agitation et collecter ensuite les cellules par centrifugation en vue de l'extraction protéique.

11. EXTRACTION DES PROTEINES D'INTERET

Matériel

DTT ; SDS ; β -Mercaptoéthanol ; Glycérol ; Bleu de Bromophénol ; Lysozyme ; Triton X-100; Tween-20 ; Urée

Membrane de porosité 0,45µm (Millipore)

T7tag affinity purification kit (Novagen)

Tampon Bind/Wash T7-Tag (10x) : Na_2HPO_4 42,9 mM, KH_2PO_4 14,7 mM, KCl 27 mM, NaCl 1,37 mM, Tween-20 1%, azoture de sodium 0,02% (pH 7.3)

Tampon de chargement (5x) : Tris 250 mM, DTT 500mM, SDS 10%, β -Mercaptoéthanol 10%, Glycérol 50%, bleu de bromophénol 0,25% (pH 6.8)

Sonicateur « Bandelin sonoplus » HD 2070 (Bandelin electronic, Germany)

Protocoles

11.1 Extraction au départ de 500 μl de suspension bactérienne

1. Centrifuger 500 μl de suspension bactérienne (cfr 10.1) à 13000 rpm pendant 5 minutes à 4°C.
2. Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans 50 μl de tampon de chargement (1x).
3. Chauffer les échantillons à 100°C pendant au moins 10 minutes, les mettre sur glace et casser les bactéries par sonication pendant 30 secondes à une puissance de 40%. Conserver les échantillons à -20°C. Prélever 10 μl en vue de l'analyse sur gel SDS-PAGE.

11.2 Extraction au départ de 1 litre de suspension bactérienne

1. Centrifuger 1 litre de culture bactérienne (cfr 10.3) à 5000 rpm pendant 5 minutes à 4°C, éliminer le surnageant et reprendre le culot dans 100 ml de tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8.
2. Ajouter du lysozyme à une concentration finale de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et 10 ml d'une solution 1% de Triton X-100. Incuber à 30°C pendant 15 minutes.
3. Placer l'échantillon dans un bain de glace et le soniquer pendant 2x 1minute à une puissance de 40 % de manière à ce que la solution perde sa viscosité.
4. Centrifuger l'échantillon à 12000 rpm à 4°C pendant 15 minutes. Pour l'analyse en SDS-PAGE, prendre 10 μl du surnageant contenant les protéines solubles et y ajouter 2,5 μl de tampon de chargement. Le culot contenant les protéines insolubles est repris dans 1 ml de tampon de chargement 1x. Garder les échantillons à -20°C.

11.3 Extraction au départ de 100 ml de suspension bactérienne, en vue de l'isolement de la protéine d'intérêt avec le « T7-Tag affinity purification kit » (Novagen)

1. Centrifuger 100 ml de suspension bactérienne (cfr 10.4) à 5500 rpm pendant 5 minutes à 4°C. NB : Avant cette centrifugation, prélever 500 µl de la culture pour vérifier, en SDS-PAGE, la production de la protéine cible par les bactéries avant d'entamer le processus de purification.
2. Eliminer le surnageant, laisser sécher le culot quelques minutes et le reprendre dans 10 ml de tampon Bind-Wash T7-Tag (1x) qui ne contient pas d'urée.
3. Placer l'échantillon dans un bain de glace et soniquer deux fois une minute à une puissance de 40% pour casser les bactéries. Centrifuger à 13000 rpm à 4°C pendant 15 minutes pour collecter les corps d'inclusion.
4. Le surnageant contenant les débris est éliminé et le culot est resuspendu dans 10 ml de Bind-Wash (1x) sans urée en soniquant deux fois une minute.
5. Recentrifuger une fois l'échantillon comme décrit ci-dessus, éliminer le surnageant et laisser sécher le culot quelques minutes.
6. Resuspendre le culot dans 10 ml de tampon Bind-Wash (1x) contenant de l'urée 6M et incubé dans la glace pendant une heure afin de solubiliser les protéines.
7. Eliminer les composants insolubles par centrifugation à 18000 rpm à 4°C pendant 20 minutes, filtrer le surnageant à travers une membrane de 0,45 µm avant de procéder à la purification sur la colonne T7-Tag. Conserver 50 µl de cette solution filtrée afin de vérifier l'efficacité de l'extraction par dépôt sur un gel SDS-PAGE.
8. Diluer l'extrait protéique avec du tampon Bind-Wash T7-Tag (1x) pour ramener la concentration en urée à 2M avant son chargement sur la colonne d'affinité.

12. PURIFICATION DES PROTEINES AVEC LE «T7-Tag AFFINITY PURIFICATION KIT»

Principe

Le kit « T7tag affinity purification » (Novagen) est basé sur l'interaction spécifique de la protéine de fusion cible, protéine fusionnée à un T7tag, avec un anticorps anti-T7tag immobilisé sur une résine de chromatographie.

Matériel

T7-Tag affinity purification kit (Novagen)

Tampon Bind-Wash T7-Tag (10x) : Na_2HPO_4 42,9 mM, KH_2PO_4 14,7 mM, KCl 27 mM, NaCl 1,37 mM, Tween-20 1%, azoture de sodium 0,02% (pH 7.3)

Tampon d'élution (10x) : acide citrique 1M (pH 2.2)

Tampon de neutralisation (1x) : Tris 2 M (pH 10.4)

Protocole

1. Mettre la colonne de chromatographie sur le support adéquat et déposer 5 ml de tampon Bind-Wash (1x) maintenu à température ambiante, afin d'éliminer la présence de bulles d'air sur le verre frité.
2. Laisser la résine T7-Tag antibody agarose à température ambiante et la déposer dans la colonne de chromatographie.
3. Equilibrer la résine par lavage avec 10 ml de tampon Bind-Wash (1x) et charger ensuite l'échantillon protéique (\pm 30 ml) maintenu à température ambiante. Récolter la fraction protéique non liée à la colonne (flow-through), qui sera analysée sur gel SDS-PAGE en même temps que les éluats.
4. Laver la colonne avec 10 ml de tampon Bind-Wash (1x).
5. Préparer des tubes Eppendorf contenant 150 μl de tampon de neutralisation. Eluer la protéine retenue sur la colonne avec 6 ml de tampon d'élution (1x), récolter \pm 1 ml par tube et mélanger immédiatement le contenu de chaque tube par inversion dans le but d'homogénéiser l'éluat et le tampon de neutralisation. Placer les tubes dans la glace au fur et à mesure de l'élution.
6. Laver la colonne avec 10 ml de tampon Bind-Wash (1x) et ajouter de l'azoture pour la conservation. Mettre les bouchons de part et d'autre de la colonne et la stocker à 4°C, de même que les tampons.

13. CONCENTRATION DES PROTEINES

Matériel

Colonnes Centricon (Millipore) cut-off 5000 daltons

BIO-RAD**Prestained SDS-PAGE Standards
Broad Range
Catalog 161-0318; Control 69804**

Protein	Calculated MW (kDa)
Myosin	201,000
β-galactosidase	130,000
Bovine serum albumin	94,000
Ovalbumin	48,500
Carbonic dehydrase	36,400
Soybean trypsin inhibitor	29,800
Lysozyme	20,600
Aprotinin	6,600

CLM1916 REV A

Bio-Rad Laboratories • 2222 Alfred Nobel Drive • Hercules, CA 94547

Marqueur de poids moléculaire protéique

Protocole

1. Remplir la colonne d'eau désionisée et centrifuger celle-ci à 4000 rpm pendant 15 minutes à 4°C
2. Charger l'échantillon sur la colonne et centrifuger à 4000 rpm jusqu'à ce qu'il ne reste que 1/10 du volume déposé dans la colonne. L'échantillon sera de cette façon concentré 10x.

14. ELECTROPHORESE EN GEL SDS-PAGE (méthode de Laemmli)

Matériel

Tampon de chargement (5x) : Tris 250 mM, DTT 500 mM, SDS 10%, β - Mercaptoéthanol 10%, Glycérol 50%, Bleu de Bromophénol 0,25% (pH 6,8) ; 30% Acrylamide/Bis Solution, 37.5 :1 (2,6% C) (Biorad n° 161-0158) ; SDS : Sodium dodecyl sulfate ; APS : Ammonium persulfate; TEMED : N,N,N',N'-tetramethyl-ethylenediamine

Tampon d'électrophorèse : Tris 25mM, Glycine 250 mM, SDS 0,1% (pH 8,3)

Cuve d'électrophorèse : Mini- PROTEAN II and ready gel accessories (Bio-Rad, 165-2944) et Protean II xi cell (Bio-Rad, 165-1814)

Standards : Prestained SDS-PAGE standard (Bio-Rad, n° Catalog 161-0318, Control 89804), dont les constituants sont présentés ci-contre.

Solution de coloration : Coomassie Brilliant Blue R250 0,1%, Méthanol 40%, H₂O 50%, Acide acétique 10%

Solution de décoloration : Méthanol 40%, Acide acétique 10%, H₂O 50%

Protocoles

14.1 Préparation des gels

Deux pourcentages de gel ont été testés. Leur composition est décrite ci-dessous :

	Gel de migration 8% (10ml)	Gel de migration 10% (10ml)	Gel d'empilement 5% (5ml)
H ₂ O	4,6 ml	4,0 ml	3,4 ml
30% acrylamide mix	2,7 ml	3,3 ml	0,83 ml
Tris *	2,5 ml	2,5 ml	0,63 ml
SDS 10%	0,1 ml	0,1 ml	0,05 ml
APS 10%	0,1 ml	0,1 ml	0,05 ml
TEMED	0,006 ml	0,004 ml	0,005 ml

* Tampon Tris 1.5 M (pH 8.8) dans le cas du gel de migration et tampon Tris 1 M (pH 6.8) dans le cas du gel d'empilement.

Après avoir ajouté les deux catalyseurs (APS et TEMED) au mélange acrylamide-bisacrylamide, couler le Running Gel (5 ml pour les gels 7x10 cm et 60 ml pour les gels 16x20 cm) entre deux plaques de verre séparées par des espaceurs. Après polymérisation (\pm 30 minutes pour les gels de 7x10 cm et \pm 60 minutes pour les gels de 16x20 cm), placer le peigne et couler le gel d'empilement (2ml pour les gels 7x10 cm et 30 ml pour les gels 16x20 cm)

Après la polymérisation du gel d'empilement (\pm 30 minutes) , enlever le peigne et rincer les puits avec quelques ml de tampon d'électrophorèse.

14.2 Chargement des échantillons et migration

NB : Les protéines soumises à l'électrophorèse ont été directement solubilisées dans un tampon de chargement une fois concentré ou soit mélangées avec ce tampon de chargement 5x dans les proportions de 2,5 μ l de tampon pour 10 μ l d'échantillon protéique. Lors de ce mémoire, les puits ont toujours été chargés avec 10 μ l d'échantillon.

L'électrophorèse est réalisée dans une cuve prévue à cet effet, sous une tension de 150V pour les gels 7x10 cm. Dans le cas des gels 16x20 cm, la migration est réalisée sous tension de 0,3 V, une intensité de 140 mA et une puissance de 20W.

14.3 Détection des protéines

Après migration électrophorétique, on retire le gel de son support de verre et on le plonge dans la solution de coloration pendant 30 minutes. Pour visualiser les protéines on décolore progressivement le gel par incubations successives dans la solution de décoloration.

15. DOT-BLOT ET WESTERN-BLOT

Principe

La détection des protéines en dot-blot et Western-blot est basée sur la reconnaissance d'un antigène d'intérêt immobilisé sur un support solide, en l'occurrence une membrane de nitrocellulose, par des anticorps spécifiques (présents dans le sérum des animaux immunisés), eux-mêmes reconnus par des anticorps secondaires (couplés à une enzyme telle la phosphatase alcaline). La conversion catalysée par l'enzyme d'une substance soluble en un précipité insoluble permet de visualiser les complexes antigène-anticorps formés.

Matériel

Membrane de nitrocellulose (Hybond TM- C extra, Amersham)

Tampon de transfert : Tris 25 mM, glycine 192 mM, MeOH 20%, pH 8.3

TBST (10 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)

TBST + 3% de BSA (Sigma)

Anticorps monoclonaux murins anti-T7tag couplés à la phosphatase alcaline (Novagen)

Anticorps secondaires anti-lapin (Sigma) et anti-poule (Sigma) couplés à la phosphatase alcaline

Solution de révélation : Tris- HCl 0,1 M, (pH 9,5), 0,05 M MgCl₂ + 37,5 µl de X phosphate/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Roche) + 50 µl de NBT (nitro-blue-tetrazolium) (Roche)

Protocoles

15.1 Dot- blot

1. Découper un morceau de membrane de nitrocellulose de taille appropriée.
2. Incuber la membrane de nitrocellulose dans de l'eau désionisée pendant 10 minutes. Laisser sécher la membrane à l'air libre pendant 10 minutes.
3. Déposer 1 µl d'échantillon directement sur la membrane de nitrocellulose et laisser sécher à l'air libre pendant 15 minutes. Recommencer l'opération.
4. Incuber la membrane de nitrocellulose dans une solution de TBST + BSA à température ambiante pendant 30 minutes.
5. Incuber la membrane avec une dilution de l'anticorps primaire dans une solution TBST. Cette opération a lieu à température ambiante pendant 30 minutes (sous agitation).
6. Laver la membrane 3 fois dans la solution TBST pendant 5 minutes (sous agitation).
7. Incuber la membrane avec une dilution de l'anticorps secondaire dans une solution de TBST (1:30000 pour l'anti-lapin et 1:50000 pour l'anti-poule)
8. Laver la membrane 3 fois dans la solution TBST pendant 5 minutes (sous agitation).
9. Révéler le blot en l'incubant dans la solution de révélation à température ambiante pendant quelques minutes.
10. Pour arrêter la réaction, plonger la membrane dans de l'eau désionisée.

Remarque : dans le cas des tests d'inhibition, le sérum de lapin a été dilué de manière appropriée dans le tampon TBST et pré-incubé avec les antigènes testés pendant 1 heure à

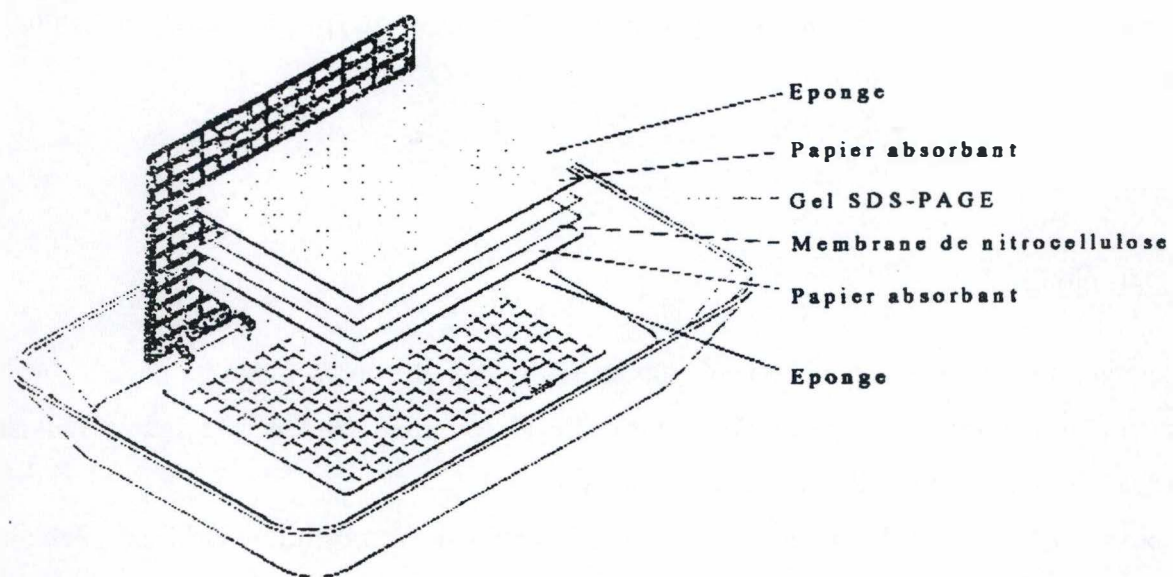


Schéma de montage de la cassette pour le transfert de protéines sur une membrane de nitrocellulose.

température ambiante sous agitation. Il a ensuite été centrifugé 10 min à 4°C (13 000 rpm) avant utilisation.

15.2 Western - blot

** Transfert des protéines*

1. Découper un morceau de membrane de nitrocellulose de taille appropriée.
2. Incuber la membrane de nitrocellulose dans de l'eau désionisée pendant cinq minutes et l'équilibrer dans le tampon de transfert pendant cinq autres minutes.
3. Après l'électrophorèse des protéines sur gel SDS-PAGE, équilibrer le gel dans le tampon de transfert pendant 5 minutes.
4. Assembler la cassette de transfert dans le tampon de transfert en évitant la formation de bulles d'air (voir ci-contre).
5. Remplir la cuve de transfert avec du tampon jusqu'au niveau minimum et y placer la cassette de transfert. Réajuster le niveau de tampon si nécessaire.
6. Placer un barreau magnétique dans le fond de la cuve et connecter celle-ci à un bain thermostatisé à 4°C.
7. Réaliser le transfert des protéines du gel SDS-PAGE vers la membrane de nitrocellulose pendant un temps dépendant du poids moléculaire de la protéine d'intérêt (4 heures de transfert dans le cas de l'UDP gldh sur un gel 8%). L'ampérage est fixé à 1 A. Vérifier que le transfert a bien eu lieu par coloration et décoloration du gel SDS-PAGE.

**Immunomarquage*

1. Incuber la membrane de nitrocellulose dans une solution de TBST + BSA à température ambiante pendant 30 minutes.
2. Incuber la membrane avec une dilution de l'anticorps primaire dans une solution de TBST. Cette opération a lieu à température ambiante sous agitation durant 30 minutes.
3. Laver la membrane 3 fois dans la solution TBST pendant 5 minutes sous agitation.
4. Incuber la membrane avec une dilution de l'anticorps secondaire dans une solution de TBST (1:30000 pour l'anti-lapin et 1:50000 pour l'anti-poule). Cette opération a lieu à température ambiante sous agitation pendant 30 minutes.
5. Laver la membrane 3 fois dans la solution de TBST pendant 5 minutes et sous agitation.

6. Révéler le blot en l'incubant dans la solution de révélation à température ambiante pendant ± 5 minutes.

7. Pour arrêter la réaction, plonger la membrane dans de l'eau désionisée.

Remarque : dans le cas des tests d'inhibition, le sérum de lapin a été dilué de manière appropriée dans le tampon TBST et pré-incubé avec les antigènes testés pendant une heure à température ambiante sous agitation. Il a ensuite été centrifugé 10 min à 4°C (13 000 rpm) avant utilisation.

16. IMMUNISATIONS

Matériel

Deux peptides synthétisés et couplés à la KLH par la société Eurogentec (Seraing, Belgique).

La séquence et la position des peptides cibles sur la séquence de la protéine d'intérêt est présentée dans la parties Résultats et discussion à la Figure 9.

Adjuvant QuilA (Superfos Biosector, Frederikssund, Danemark)

Protocole

Préparer le mélange suivant :

125 μ l de la solution peptide 1-KLH (correspond à 150 μ g de peptide 1 et 225 μ g de KLH)

125 μ l de la solution peptide 2-KLH (correspond à 150 μ g de peptide 2 et 225 μ g de KLH)

250 μ l de QuilA (0,33 mg/ml en PBS)

Injecter le mélange à un lapin et à une poule en sous-cutané.

Les rappels ont été effectués selon le calendrier suivant :

POULE

1^{er} rappel : 2 semaines après l'immunisation

2^{ème} rappel : 4 semaines après l'immunisation

3^{ème} rappel : 8 semaines après l'immunisation

4^{ème} rappel : 12 semaines après l'immunisation

LAPIN

1^{er} rappel : 1 semaine après l'immunisation

2^{ème} rappel : 4 semaines après l'immunisation

3^{ème} rappel : 8 semaines après l'immunisation

4^{ème} rappel : 9 semaines après l'immunisation

5^{ème} rappel : 12 semaines après l'immunisation

16.1 Isolement d'anticorps de lapin

Prélever 2 ml de sang une semaine après chaque rappel, laisser le sang sur table à température ambiante durant 2-3 heures et centrifuger ensuite durant 10 minutes à 4000 rpm à 4°C de manière à récolter le sérum. Aliquoter et stocker à – 20°C.

16.2 Isolement d'anticorps à partir d'œuf de poule

Matériel

Œuf ; eau ; berlin taré (200 ml) ; tubes Falcon (50 ml) ; seringue ;

solution saturée en sulfate d'ammonium (> 767 gr/l à 25°C)

Filtre de porosité 0,45µm

Protocole

Le protocole utilisé nous a été aimablement fourni par le Dr. P. Mertens (URBM).

1. Si l'œuf vient du frigo, le laisser se réchauffer à température ambiante, le casser et garder le jaune.
2. Laver le jaune en le baignant dans de l'eau de manière à éliminer toutes les traces d'ovalbumine.
3. Prélever le liquide du jaune et le mettre dans un berlin taré, le peser et ajouter 10 fois sa masse en eau.
4. Bien mélanger et répartir dans des tubes Falcon de 50 ml. Congeler une nuit à – 20°C afin de précipiter les lipides.
5. Décongeler et centrifuger 45 min à 4°C à 2500g .
6. Garder le surnageant, le filtrer sur 0,45µm et y ajouter 1/3 de volume de solution saturée en sulfate d'ammonium, mélanger par inversion.
7. Garder 20 minutes sur table puis centrifuger 30 minutes à 4°C à 2500g.
8. Au surnageant, ajouter ¼ de volume de solution saturée en sulfate d'ammonium. Garder 20 minutes sur table puis centrifuger 30 minutes à 4°C à 2500g.
9. Éliminer le surnageant, recentrifuger une minute et éliminer toute trace de surnageant.
10. Resuspendre avec le volume désiré (typiquement un ml) de Thimérosal 0,1 % en PBS.

17. EXTRACTION DE PROTEINES VEGETALES

Matériel

Cellules de carotte cultivées en suspension : culture de 2 jours

Tampon d'extraction : K-phosphate 50 mM pH 7,5 + 2 Mm EDTA + 5mM DTT + 0,5 mM PMSF + 0,5% PVP

Protocole

1. Peser 400 mg de cellules et les broyer dans de l'azote liquide.
2. Ajouter 2 ml de tampon aux cellules réduites en fine poudre et répartir cette solution dans des eppendorfs.
3. Centrifuger 10 minutes à 13000 rpm et à 4°C, et récupérer le surnageant que l'on aliquote par 100 µl. Stocker à -70°C.

18. DOSAGE DE PROTEINES

Matériel

Bio-Rad Protein assay (ref 500-0006)

Protocole

1. Préparer une gamme étalon avec de la BSA diluée en PBS (0,2 à 1 mg/ml).
2. Déposer 100 µl de chacune des solutions étalons dans des tubes en verre. Le blanc est constitué de 100 µl de PBS.
3. Mettre également 100 µl de chaque échantillon à doser dans des tubes.
4. Ajouter 5 ml de réactif de dosage préalablement dilué 5x en eau.
5. Vortexer et lire l'absorbance à 595 nm.
6. Déterminer la concentration en protéine de l'échantillon à partir de la droite de régression obtenue.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. LA DEMARCHE SUIVIE

Les principales étapes suivies dans le cadre de ce travail sont présentées ci-dessous :

1. Recherche des séquences des UDP-glucose déhydrogénases végétales dans les banques de données et choix des peptides en vue des immunisations.
2. Détermination des amorces en vue de l'amplification par PCR d'un gène codant pour une UDP-gldh d'*Arabidopsis thaliana*.
3. Clonage du produit PCR dans le vecteur pCRII, criblage des colonies et séquençage complet du gène cloné à l'aide d'amorces internes.
4. Sous-clonage du gène codant pour une UDP-gldh dans le vecteur d'expression pET 17b, vérification de la conservation de la phase et transformation de bactéries TOP10.
5. Transformation de bactéries BL21DE3 avec le vecteur recombinant pET 17b-UDP-gldh et cinétiques d'expression de la protéine recombinante.
6. Caractérisation des anticorps obtenus par des tests dot-blots et Western-blots afin de vérifier leur reconnaissance de l'UDP-gldh recombinante. Application à des extraits de protéines végétales.

En résumé, les séquences protéiques et nucléotidiques correspondant à l'UDP-gldh ont d'abord été recherchées dans les banques de données. Les alignements de séquences protéiques ont permis de mettre en évidence des zones conservées dans lesquelles ont été choisis deux peptides qui ont été utilisés pour immuniser un lapin et une poule. A partir d'une séquence nucléotidique de référence, nous avons défini des amorces contenant des sites de restriction de manière à pouvoir amplifier par PCR le gène codant pour l'UDP-gldh au départ d'ADNc d'*Arabidopsis thaliana*. Le produit PCR généré a été cloné dans un premier vecteur adapté pour le clonage de séquences amplifiées à l'aide de la Taq polymérase. L'identité du gène d'intérêt a été vérifiée par séquençage et nous avons ensuite procédé au sous-clonage de l'insert dans un vecteur d'expression bactérien, le vecteur pET17b. Le vecteur recombinant pET17b-UDP-gldh a été utilisé par la suite pour transformer des bactéries BL21DE3 capables de produire la protéine recombinante. Des extraits protéiques ont été préparés à partir des cultures de bactéries transformées de manière à vérifier la présence de l'enzyme d'intérêt par une électrophorèse sur gel d'acrylamide en condition dénaturante (gel SDS-PAGE). Les réponses des animaux immunisés ont été caractérisées par dot-blots et Western-blots.

Nous allons décrire dans ce qui va suivre les principaux résultats obtenus suite à cette démarche.

T08818	1	MVKICICGAGYVGGPTMAVIALKCPSEI	AAVNDISKSRIA	AAVNSDQLPIYEPGLD	GVVKQCRGKNLFFSTDVEKHVFEAD
Q96558	1	MVKICICGAGYVGGPTMAVIALKCPSEI	AAVNDISKSRIA	AAVNSDQLPIYEPGLD	GVVKQCRGKNLFFSTDVEKHVFEAD
AAB58398	1	MVKICICGAGYVGGPTMAVIALKCPSEI	AAVNDISKSRIA	AAVNSDQLPIYEPGLD	GVVKQCRGKNLFFSTDVEKHVFEAD
BAB02581	1	MVKICICGAGYVGGPTMAVIALKCPD	VEAVVDISVPRIN	AAVNSDQLPIYEPGLDD	VVKQCRGKNLFFSTDVEKHVFEAD
BAB11006	1	MVKICICGAGYVGGPTMAVIALKCPD	IEAVVDISVPRIN	AAVNSDQLPIYEPGLDD	VVKQCRGKNLFFSTDVEKHVFEAD
CAC01748	1	MVKICICGAGYVGGPTMAVIALKCPSEI	AAVNDISKSRIA	AAVNSDQLPIYEPGLD	GVVKQCRGKNLFFSTDVEKHVFEAD
T51527	1	MVKICICGAGYVGGPTMAVIALKCPSEI	AAVNDISKSRIA	AAVNSDQLPIYEPGLD	GVVKQCRGKNLFFSTDVEKHVFEAD
AAK16194	1	MVKICICGAGYVGGPTMAVIALKCPA	IEVVVDISKPRID	AAVNSDQLPIYEPGLD	EVVKECRGRNLFSTDVEKHVFEAD
AAF04455	1	MVKICICGAGYVGGPTMAVIALKCPSEI	AAVNDISKSRIA	AAVNSDQLPIYEPGLD	GVVKQCRGKNLFFSTDVEKHVFEAD
T08818	81	IVFVSVNTPTKTQ	GLGAGKAADLT	WESAARM	IADVSKSDKIVVEKSTVPVKTA
Q96558	81	IVFVSVNTPTKTQ	GLGAGKAADLT	WESAARM	IADVSKSDKIVVEKSTVPVKTA
AAB58398	81	IVFVSVNTPTKTQ	GLGAGKAADLT	WESAARM	IADVSKSDKIVVEKSTVPVKTA
BAB02581	81	IVFVSVNTPTKTQ	GLGAGKAADLT	WESAARM	IADVSKSDKIVVEKSTVPVKTA
BAB11006	81	IVFVSVNTPTKTQ	GLGAGKAADLT	WESAARM	IADVSKSDKIVVEKSTVPVKTA
CAC01748	81	IVFVSVNTPTKTQ	GLGAGKAADLT	WESAARM	IADVSKSDKIVVEKSTVPVKTA
T51527	81	IVFVSVNTPTKTQ	GLGAGKAADLT	WESAARM	IADVSKSDKIVVEKSTVPVKTA
AAK16194	81	IVFVSVNTPTKTQ	GLGAGKAADLT	WESAARM	IADVSKSDKIVVEKSTVPVKTA
AAF04455	81	IVFVSVNTPTKTQ	GLGAGKAADLT	WESAARM	IADVSKSDKIVVEKSTVPVKTA
T08818	161	EGTAIKDLFNPDRVLIGGRETPEGQ	KAIQTLKD	VYAQWVPEERILTTNL	WSAELSKLAANAFLAQRISSVNAMSALCEAT
Q96558	161	EGTAIKDLFNPDRVLIGGRETPEGQ	KAIQTLKD	VYAQWVPEERILTTNL	WSAELSKLAANAFLAQRISSVNAMSALCEAT
AAB58398	161	EGTAIKDLFNPDRVLIGGRETPEGQ	KAIQTLKD	VYAQWVPEERILTTNL	WSAELSKLAANAFLAQRISSVNAMSALCEAT
BAB02581	161	EGTAIKDLFNPDRVLIGGRETPEGQ	KAIQTLKD	VYAQWVPEERILTTNL	WSAELSKLAANAFLAQRISSVNAMSALCEAT
BAB11006	161	EGTAIKDLFNPDRVLIGGRETPEGQ	KAIQTLKD	VYAQWVPEERILTTNL	WSAELSKLAANAFLAQRISSVNAMSALCEAT
CAC01748	161	EGTAIKDLFNPDRVLIGGRETPEGQ	KAIQTLKD	VYAQWVPEERILTTNL	WSAELSKLAANAFLAQRISSVNAMSALCEAT
T51527	161	EGTAIKDLFNPDRVLIGGRETPEGQ	KAIQTLKD	VYAQWVPEERILTTNL	WSAELSKLAANAFLAQRISSVNAMSALCEAT
AAK16194	161	EGTAIKDLFNPDRVLIGGRETPEGQ	KAIQTLKD	VYAQWVPEERILTTNL	WSAELSKLAANAFLAQRISSVNAMSALCEAT
AAF04455	161	EGTAIKDLFNPDRVLIGGRETPEGQ	KAIQTLKD	VYAQWVPEERILTTNL	WSAELSKLAANAFLAQRISSVNAMSALCEAT
T08818	241	GANVQVSVSVGTDSRIGPKFLNASV	GGGSCFQKDILNL	VYICECNGLPEVAEYWKQVIKINDY	QKSREVNRRVASMEN
Q96558	241	GANVQVSVSVGTDSRIGPKFLNASV	GGGSCFQKDILNL	VYICECNGLPEVAEYWKQVIKINDY	QKSREVNRRVASMEN
AAB58398	241	GANVQVSVSVGTDSRIGPKFLNASV	GGGSCFQKDILNL	VYICECNGLPEVAEYWKQVIKINDY	QKSREVNRRVASMEN
BAB02581	241	GADVTVSVYAVGTDSRIGPKFLNASV	GGGSCFQKDILNL	VYICECNGLPEVAEYWKQVIKINDY	QKSREVNRRVASMEN
BAB11006	241	GADVTVSVYAVGTDSRIGPKFLNASV	GGGSCFQKDILNL	VYICECNGLPEVAEYWKQVIKINDY	QKSREVNRRVASMEN
CAC01748	241	GANVSEVSVYAVGKDSRIGPKFLNASV	GGGSCFQKDILNL	VYICECNGLPEVAEYWKQVIKINDY	QKSREVNRRVASMEN
T51527	241	GANVSEVSVYAVGKDSRIGPKFLNASV	GGGSCFQKDILNL	VYICECNGLPEVAEYWKQVIKINDY	QKSREVNRRVASMEN
AAK16194	241	GANVTEVAVYAVGKDSRIGPKFLNASV	GGGSCFQKDILNL	VYICECNGLPEVAEYWKQVIKINDY	QKSREVNRRVASMEN
AAF04455	241	GADVAEVSVYAVGKDSRIGPKFLNASV	GGGSCFQKDILNL	VYICECNGLPEVAEYWKQVIKINDY	QKSREVNRRVASMEN
T08818	321	TVSNKKIAILGFAFKKDTGDTRET	PAIDVCGQLLGDKANLSIYDPQVTE	DQIQRDLSMNKFDWDHPIHLQPTSP	-TTVKK
Q96558	321	TVSNKKIAILGFAFKKDTGDTRET	PAIDVCGQLLGDKANLSIYDPQVTE	DQIQRDLSMNKFDWDHPIHLQPTSP	-TTVKK
AAB58398	321	TVSNKKIAILGFAFKKDTGDTRET	PAIDVCGQLLGDKANLSIYDPQVTE	DQIQRDLSMNKFDWDHPIHLQPTSP	-TTVKK
BAB02581	321	SVSNKKIAVLGFAFKKDTGDTRET	PAIDVCGQLLGDKANLSIYDPQVTE	DQIQRDLSMNKFDWDHPIHLQPTSP	-TTVKK
BAB11006	321	TVSNKKIAVLGFAFKKDTGDTRET	PAIDVCGQLLGDKANLSIYDPQVTE	DQIQRDLSMNKFDWDHPIHLQPTSP	-TTVKK
CAC01748	321	TVSNKKIAVLGFAFKKDTGDTRET	PAIDVCGQLLGDKANLSIYDPQVTE	DQIQRDLSMNKFDWDHPIHLQPTSP	-TTVKK
T51527	321	TVSNKKIAVLGFAFKKDTGDTRET	PAIDVCGQLLGDKANLSIYDPQVTE	DQIQRDLSMNKFDWDHPIHLQPTSP	-TTVKK
AAK16194	321	TVSGKKIAVLGFAFKKDTGDTRET	PAIDVCGQLLGDKANLSIYDPQVTE	DQIQRDLSMNKFDWDHPIHLQPTSP	-TAFFKQ
AAF04455	321	TVSQKKIAILGFAFKKDTGDTRET	PAIDVCGQLLGDKANLSIYDPQVTE	DQIQRDLSMNKFDWDHPIHLQPTSP	-TAFFKQ
T08818	400	VSVVWDAYEATKDAHGLCILTEWDE	FKTLDYQKIFDNMQKPAFVFDGRN	IVDADKLREIGFIVYSIGKPLDPWLKDM	PAV
Q96558	400	VSVVWDAYEATKDAHGLCILTEWDE	FKTLDYQKIFDNMQKPAFVFDGRN	IVDADKLREIGFIVYSIGKPLDPWLKDM	PAV
AAB58398	400	VSVVWDAYEATKDAHGLCILTEWDE	FKTLDYQKIFDNMQKPAFVFDGRN	IVDADKLREIGFIVYSIGKPLDPWLKDM	PAV
BAB02581	400	VTVTWDAYEATKDAHGLCILTEWDE	FKTLDYQKIFDNMQKPAFVFDGRN	IVDADKLREIGFIVYSIGKPLDPWLKDM	PAV
BAB11006	400	VSVVWDAYEATKDAHGLCILTEWDE	FKTLDYQKIFDNMQKPAFVFDGRN	IVDADKLREIGFIVYSIGKPLDPWLKDM	PAV
CAC01748	400	VSVVWDAYEATKDAHGLCILTEWDE	FKTLDYQKIFDNMQKPAFVFDGRN	IVDADKLREIGFIVYSIGKPLDPWLKDM	PAV
T51527	399	VSVVWDAYEATKDAHGLCILTEWDE	FKTLDYQKIFDNMQKPAFVFDGRN	IVDADKLREIGFIVYSIGKPLDPWLKDM	PAV
AAK16194	400	VSVVWDAYEATKDAHGLCILTEWDE	FKTLDYQKIFDNMQKPAFVFDGRN	IVDADKLREIGFIVYSIGKPLDPWLKDM	PAV
AAF04455	401	VTVTSDAYEATKDAHGLCILTEWDE	FKTLDYQKIFDNMQKPAFVFDGRN	IVDADKLREIGFIVYSIGKPLDPWLKDM	PAV
T08818	480	A	Code d'accès Genbank	T08818 UDP-gldh de soja	
Q96558	480	A	Code d'accès Genbank	Q96558 UDP-gldh de soja	
AAB58398	480	A	Code d'accès Genbank	AAB58398 UDP-gldh de soja	
BAB02581	480	A	Code d'accès Genbank	BAB02581 UDP-gldh d'Arabidopsis	
BAB11006	480	V	Code d'accès Genbank	BAB11006 UDP-gldh d'Arabidopsis	
CAC01748	480	A	Code d'accès Genbank	CAC01748 UDP-gldh like d'Arabidopsis	
T51527	479	A	Code d'accès Genbank	T51527 UDP-gldh like d'Arabidopsis	
AAK16194	480	A	Code d'accès Genbank	AAK16194 UDP-gldh d'Oryza sativa	
AAF04455	481	A	Code d'accès Genbank	AAF04455 UDP-gldh de peuplier	

Figure 9 : Comparaison des séquences protéiques d'UDP-gldh végétales. Les acides aminés soulignés correspondent aux peptides de synthèse proposés par Eurogentec en vue des immunisations, ceux encadrés ont été choisis dans notre travail. La séquence de référence choisie est celle d'une UDP-gldh d'Arabidopsis portant le n° d'accès BAB02581.

2. RECHERCHES DANS LES BANQUES DE DONNEES ET CHOIX DES PEPTIDES EN VUE DES IMMUNISATIONS.

La recherche des séquences codant pour des UDP-gldh végétales a été réalisée via Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>). L'alignement des six séquences protéiques trouvées au début de notre travail a mis en évidence l'existence de nombreuses zones conservées entre ces différentes protéines. Une dernière consultation des banques de données effectuée avant la rédaction de ce manuscrit nous a permis de trouver trois nouvelles séquences (n° d'accès Genbank : BAB11006, T51527 et AAK16194). L'alignement de ces 9 séquences à l'aide des logiciels BCM Search launcher et Boxshade 3.21 (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html> et http://www.isrec.isb-sib.ch:8080/software/BOX_form.html) est montré à la Figure 9. Nous pouvons y noter le haut degré de conservation (>95%) des séquences en acides aminés des différentes protéines. Des cinq peptides (Figure 9, soulignés) les plus immunogènes proposés par Eurogentec (Seraing, Belgique) sur base de l'analyse des séquences que nous leur avons envoyées, deux ont été choisis dans les zones les plus conservées (Figure 9, encadrés) de manière à pouvoir générer des sérums capables de reconnaître une gamme la plus large possible d'UDP-gldh végétales. Ces deux peptides ont été définis au départ d'une séquence d'UDP-gldh d'*Arabidopsis thaliana* (n° d'accès : BAB02581) choisie comme référence parce que d'une part, *Arabidopsis* constitue le modèle moléculaire par excellence dans le domaine végétal et que, d'autre part, la seule autre séquence d'*Arabidopsis* disponible dans les banques de données au moment où nous avons débuté ce travail était notée «UDP-gldh like» (n° d'accès : CAC01748). La séquence nucléotidique de 1443 bp du gène correspondant à cette UDP-gldh de référence, par ailleurs localisé sur le chromosome 3 d'*Arabidopsis*, est présentée à la Figure 10. Les peptides ont été synthétisés et couplés à la KLH par Eurogentec. Nous avons procédé aux immunisations d'une poule et d'un lapin par injection sous cutanée de ces peptides couplés en mélange.

Comme le but final de ce travail est d'obtenir des réactifs immunologiques spécifiques des UDP-gldh végétales, il est indispensable d'évaluer la reconnaissance de l'UDP-gldh entière par les anticorps des animaux immunisés avec les peptides de synthèse.

1 atggtgaaga tatgttgtat tggagctggg tatgttggtg gaccaacaat ggcagtgatt
 61 gcattgaaat gtccagacgt tgaagtagcg gttgttgata tctctgtacc acgtatcaac
 121 gcttggaaca gtgacacgct tccgatttac gagcctggtc ttgatgatgt tgtgaagcaa
 181 tgccgtggca agaacctttt ctttagtact gatgttgaga aacatgttag ggaagctgat
 241 attgtgtttg tttctgtcaa cacaccgact aagactagag gtcttgggtgc tggtaaagct
 301 gcggatctta cgtactggga gagcgctgcg cgtatgatcg ctgatgtttc ggtatcggat
 361 aagattgtcg ttgagaaatc gactgttccg gttaaaacag ctgaagctat tgagaagatt
 421 ttgacacata acagtaaagg gattaagttt cagattcttt cgaatcccg gtttttggcg
 481 gaaggaaccg cgattaagga cctatttaac ccggaccgtg ttcttatcgg agggcgggaa
 541 acccagaag ggtttaaagc ggtgcagact ctcaagaatg tgtatgcaca ctgggttctt
 601 gaaggccaaa tcataacaac caatctctgg tctgctgagc tgtccaagct tgcggcaaac
 661 gctttcttgg ctcaaaggat ttcactcagt aatgctatgt cggctctgtg tgaagccaca
 721 ggcgagatg tcacgcaagt gtcttacgcg gttggtacag actcaaggat tgggcccaag
 781 ttcttgaact cgagtgttgg attcgggtgg tctgttttcc agaaggacat tctgaatctt
 841 gtctacatct gtgagtgcaa cggactcccg gaagtggcag agtactggaa gcaagtcac
 901 aagatcaatg actaccagaa gagccggttc gtgaaccgtg ttgtttcttc catgttcaac
 961 tctgtatcaa acaagaagat tgcggttctc ggtttcgcat tcaagaaaga caccggtgac
 1021 acaagggaga ctccagccat cgatgtgtgc aagggtcttt tagaagacaa agcaaggcta
 1081 agcattttacg acccacaagt gactgaggat cagatccaga gggattttatc catgaacaag
 1141 ttcgactggg accatcctct acatttgcag ccaatgagcc caacaacagt gaaacaagtg
 1201 accgttaact gggacgcata cgaagcaact aaggacgctc acggtatctg catcatgacc
 1261 gagtgggatg agttcaagaa ccttgatttc cagaagatct ttgacaacat gcagaaacca
 1321 gctttcgtgt tcgatggaag aaacattatg aatctgcaaa agctaaggga gattggtttc
 1381 attgtttact ccattggtaa gcctctcgac gactggctca aggacatgcc tgccgttgcc
 1441 taa

Figure 10 : Séquence nucléotidique correspondant à la protéine de référence de l'UDP-gldh d'*Arabidopsis thaliana*. Les zones soulignées correspondent aux amorces spécifiques de la séquence. Les amorces les plus externes sont celles utilisées pour l' amplification. Les autres ont été utilisées pour le séquençage.

Au lieu de nous lancer dans des étapes fastidieuses de purification de cette enzyme au départ de tissus végétaux, nous avons choisi de produire cette protéine en bactérie, sous forme recombinante. Nous avons donc d'abord dû amplifier le gène correspondant à l'UDP-gldh de référence en vue de son clonage ultérieur dans un vecteur d'expression bactérien.

3. AMPLIFICATION PCR DU GENE CODANT POUR UNE UDP-GLDH D'ARABIDOPSIS.

L'amplification du gène codant pour l'UDP-gldh choisie comme référence dans notre travail a été réalisée en utilisant les amorces FOR UDP-gldh et REV UDP-gldh dont la localisation est présentée à la Figure 10 et dont les séquences sont les suivantes:

FOR UDP-gldh : 5' ACGTGAATTCATGGTGAAGATATGTTGT 3' (site EcoRI)

REV UDP-gldh : 5' ACGTGCGGCCGCTTAGGCDABGGCAGGCAT 3 (site NotI)

Codes de dégénérescence : D = (A,T,G) et B = (G,C,T)

Une légère dégénérescence a été introduite dans l'amorce REV de manière à couvrir la variabilité présente entre les séquences d'*Arabidopsis* à proximité du codon stop.

Les amorces ont été choisies en respectant les critères suivants :

- (1) complémentarité avec l'extrémité 5' (ATG) ou 3' (TGA) de la séquence cible ;
- (2) présence d'un site de restriction unique, c'est à dire absent de la séquence d'intérêt, permettant par la suite le sous-clonage de l'insert dans un vecteur d'expression
- (3) respect de la phase de lecture, afin d'obtenir une expression correcte de la protéine que l'on désire produire.

Toutes les amorces spécifiques de la séquence de référence décrites dans ce mémoire ont été caractérisées à l'aide du logiciel DNA strider 1.2 avant leur utilisation pour les PCR.

La liste des sites de restriction absents de la séquence d'intérêt (Figure 11), et pouvant donc être utilisés pour le clonage de l'insert dans le vecteur pET 17b (voir Matériel et Méthodes, Figure 8) a été obtenue à l'aide du logiciel DNA strider 1.2.

Les amorces décrites ci-dessus ont été utilisées pour l'amplification du gène codant pour l'UDP-gldh par PCR au départ d'ADN complémentaire (ADNc) d'*Arabidopsis thaliana* (N1092-col 0). Ces ADNc ont été synthétisés au départ d'une préparation d'ARNmessenger d'*Arabidopsis*, isolée et stockée à -70°C par Cindy Benet.

Aat II	gacgt/c	Bsu36 I	cc/tnagg	Nru I	tcg/cga
Acc65 I	g/gtacc	Dra III	cacnnn/gtg	Nsi I	atgca/t
Afl II	c/ttaag	Drd I	gacnnnn/nngtc	Pac I	ttaat/taa
AlwN I	cagnnn/ctg	Eae I	y/ggccr	Pme I	gttt/aaac
Apa I	gggcc/c	Eag I	c/ggccg	Pml I	cac/gtg
Apal I	g/tgcac	Ecl136 I	gag/ctc	Ppu10 I	a/tgcat
Apo I	r/aatty	EcoN I	cctnn/nnnagg	PshA I	gacnn/nngtc
Asc I	gg/cgcgcc	EcoR I	g/aattc	Psp1406 I	aa/cgtt
Ase I	at/taat	Ehe I	ggc/gcc	Pst I	ctgca/g
Avr II	c/ctagg	Esp3 I	cgtctc 1/5	Pvu I	cgat/cg
BamH I	g/gatcc	Fse I	ggccgg/cc	Sac I	gagct/c
Ban I	g/gyrcc	Fsp I	tgc/gca	Sac II	ccgc/gg
Bbe I	ggcgc/c	Gdi II	yggccg -5/-1	Sal I	g/tcgac
Bcg I	cgannnnntgc	HgiA I	gwgwc/c	Sfc I	c/tryag
Bcl I	t/gatca	Hpa I	gtt/aac	Sfi I	ggccnnnn/nggcc
Bgl I	gccnnnn/nggc	Kas I	g/gcgcc	Sma I	ccc/ggg
Bsa I	gggtctc 1/5	Kpn I	ggtac/c	Spe I	a/ctagt
BsaB I	gatnn/nnatc	Mcr I	c/grycg	Sph I	gcatg/c
BsaH I	gr/cgyc	Mlu I	a/cgcgt	Srf I	gccc/gggc
BsiE I	cgry/cg	Msc I	tgg/cca	Sse8337 I	cctgca/gg
BsiW I	c/gtacg	Mun I	c/aattg	Ssp I	aat/att
Bsp120 I	g/ggccc	Nae I	gcc/ggc	Stu I	agg/cct
Bsp1407 I	t/gtaca	Nar I	gg/cgcc	Sty I	c/cwwgg
BspM I	acctgc 4/8	Nco I	c/catgg	Swa I	attt/aaat
BssH II	g/cgcgc	Nde I	ca/tatg	Tth111 I	gacn/nngtc
Bst1107 I	gta/tac	NgoM I	g/ccgc	Xba I	t/ctaga
BstE II	g/gtnacc	Nhe I	g/ctagc	Xcm I	ccannnnn/nnntgg
BstX I	ccannnnn/ntgg	Not I	gc/ggccgc	Xma I	c/ccggg

Figure 11 : Liste des sites de restriction absents de la séquence de l'UDP-glhd de référence.

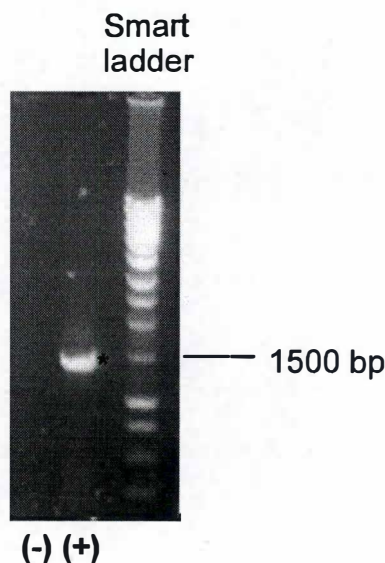


Figure12 : Amplification sur l'ADNc d'*Arabidopsis thaliana* de la séquence codant pour l'UDP-glhd

- en concentration standard de $MgCl_2$ (-)
- en présence d'un excès en $MgCl_2$ (+)

* bande attendue 1443 bp

On constate sur la Figure 12 que l'amplification s'avère optimale en présence d'un excès de $MgCl_2$ dans le mélange PCR, ces conditions permettant d'obtenir un produit PCR dont la taille correspond à celle attendue d'environ 1443 bp de l'UDP-gldh.

4. LE CLONAGE DU GENE DE L'UDP-GLDH

Le produit PCR généré précédemment a été déposé sur un gel d'agarose préparatif. Après la migration, la bande d'ADN correspondant à la séquence amplifiée a été excisée du gel et purifiée en vue de son clonage dans le vecteur pCRII. Un autre gel d'agarose a également été réalisé afin de quantifier le produit PCR purifié sur gel, dans le but d'optimiser la réaction de ligation du gène d'intérêt dans le vecteur.

Des bactéries *E. coli* de type TOP10 ont ensuite été transformées avec le produit de ligation et étalées sur milieu sélectif contenant de l'ampicilline, du X-gal et de l' IPTG, ce milieu permettant une sélection de type blanc/bleu des transformants. Les colonies blanches sont constituées des bactéries ayant incorporé le produit de ligation pCRII-UDP-gldh.

De l'ADN plasmidique (miniprep) a été préparé à partir de cultures liquides de bactéries transformées avec le plasmide recombinant pCRII-UDP-gldh. Cet ADN a été clivé avec EcoRI, ce qui a permis l'identification de 3 colonies positives sur 20 testées. Comme le montre la Figure 13 la restriction de l'ADN plasmidique contenu dans ces colonies n°4, 10 et 13 donne lieu à une bande de ± 1500 bp correspondant au gène de l'UDP-gldh et une autre bande de ± 4000 bp correspondant cette fois au vecteur pCRII (3900 bp).

Une amplification PCR a été réalisée sur les ADN plasmidiques correspondant aux 3 colonies positives à l'aide des amorces universelles M13 Forward et M13 Reverse spécifiques de la séquence du vecteur. Des amplicons de taille attendue (± 1700 bp) ont été obtenus pour les colonies 4 et 10 avec lesquelles nous avons continué notre travail (Figure 14).

L'identité du gène cloné a ensuite été vérifiée par un premier séquençage de ses extrémités 5' et 3'. Après confirmation de cette identité, le gène correspondant à l'UDP-gldh (contenu dans la colonie 10) a été entièrement séquencé grâce à l'utilisation d'amorces internes présentées à la Figure 10. Les séquences obtenues avec les différentes amorces

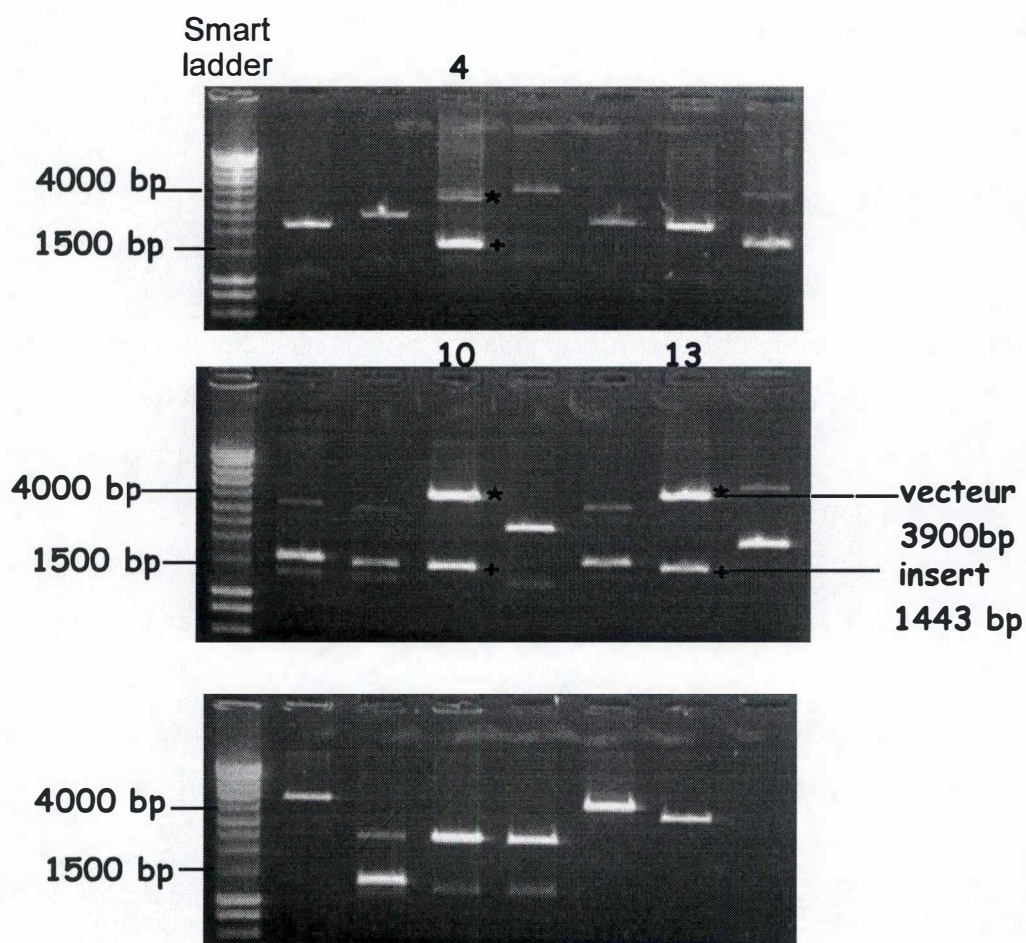


Figure 13 : Identification des bactéries TOP 10 transformées avec le vecteur recombinant pCRII-UDP-gldh. Restriction EcoRI de l'ADN plasmidique préparé à partir de bactéries en culture liquide.

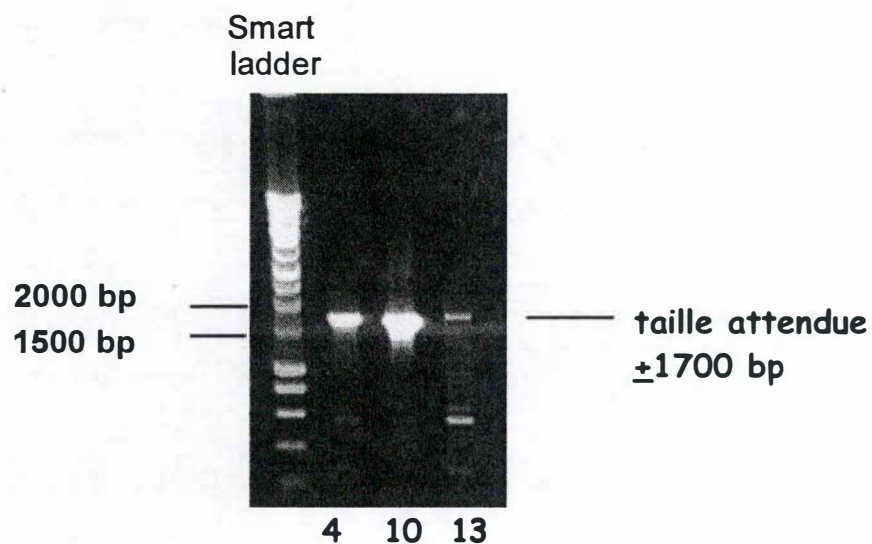


Figure 14a : Amplification PCR à l'aide d'amorces universelles sur l'ADN plasmidique préparé au départ des colonies contenant le vecteur recombinant pCRII-UDP-gldh


```

for14 1 -----
REV 1
BAB02581 1 ATGGTGAAGATATGTTGTATTGGAGCTGGGTATGTTGGTGGACCAACAATGGCAGTGATTGCATTGAAATGTCCAGACGT
int4 1 -----
for12 1 -----
int3 1 -----
rev13 1 -----
int2 1 -----
rev11 1 -----
FOR 1 ATGGTGAAGATATGTTGTATTGGAGCTGGGTATGTTGGTGGACCAACAATGGCAGTGATTGCATTGAAATGTCCAGACGT

for14 1 -----
REV 1
BAB02581 8 TGAAGTAGCGGTTGTTGATATCTCTGTACCACGTATCAACGCTTGAACAGTGACACGCTTCCGATTTACGAGCCTGGTC
int4 1 -----
for12 1 -----
int3 1 -----
rev13 1 -----
int2 1 -----
rev11 1 -----
FOR 8 TGAAGTAGCGGTTGTTGATATCTCTGTACCACGTATCAACGCTTGAACAGTGACACGCTTCCGATTTACGAGCCTGGTC

for14 1 -----
REV 1
BAB02581 16 TTGATGATGTTGTGAAGCAATGCCGTGGCAAGAACCTTTTCTTTAGTACTGATGTTGAGAAACATGTTAGGGAAGCTGAT
int4 1 -----
for12 1 -----
int3 1 -----
rev13 1 -----
int2 1 -----
rev11 1 -----
FOR 16 TTGATGATGTTGTGAAGCAATGCCGTGGCAAGAACCTTTTCTTTAGTACTGATGTTGAGAAACATGTTAGGGAAGCTGAT

for14 1 -----
REV 1
BAB02581 24 ATTGTGTTTGTCTGTCAACACACCGACTAAGACTAGAGGTCTTGGTCTGGTAAAGCTGCGGATCTTACGTACTGGG
int4 1 -----
for12 1 -----
int3 1 -----
rev13 1 -----
int2 1 -----
rev11 1 -----
FOR 24 ATTGTGTTTGTCTGTCAACACACCGACTAAGACTAGAGGTCTTGGTCTGGTAAAGCTGCGGATCTTACGTACTGGG
GGATCTTACGTACTGGG
ATTGTGTTTGTCTGTCAACACACCGACTAAGACTAGAGGTCTTGGTCTGGTAAAGCTGCGGATCTTACGTACTGGG

for14 1 -----
REV 1
BAB02581 320 AGAGCGCTGCGCGTATGATCGCTGATGTTTCGGTATCGGATAAGATTGTCGTTGAGAAATCGACTGTTCCGGTTAAACA
int4 1 -----
for12 1 -----
int3 1 -----
rev13 1 -----
int2 1 -----
rev11 1 -----
FOR 320 AGAGCGCTGCGCGTATGATCGCTGATGTTTCGGTATCGGATAAGATTGTCGTTGAGAAATCGACTGTTCCGGTTAAACA
AGAGCGCTGCGCGTATGATCGCTGATGTTTCGGTATCGGATAAGATTGTCGTTGAGAAATCGACTGTTCCGGTTAAACA
AGAGCGCTGCGCGTATGATCGCTGATGTTTCGGTATC

for14 1 -----
REV 1
BAB02581 400 GCTGAAGCTATTGAGAAGATTTTGACACATAACAGTAAAGGGATTAAGTTTCAGATTCTTTCGAATCCCGAGTTTTTGGC
int4 1 -----
for12 1 -----
int3 1 -----
rev13 1 -----
int2 1 -----
rev11 1 -----
FOR 151 GCTGAAGCTATTGAGAAGATTTTGACACATAACAGTAAAGGGATTAAGTTTCAGATTCTTTCGAATCCCGAGTTTTTGGC
GCTGAAGCTATTGAGAAGATTTTGACACATAACAGTAAAGGGATTAAGTTTCAGATTCTTTCGAATCCCGAGTTTTTGGC

for14 1 -----
REV 1
BAB02581 480 GGAAGGAACCGGATTAAGGACCTATTTAATCCGGACCGTGTCTTATCGGAGGGCGGGAACCCAGAGGGTTTAAAG
int4 1 -----
for12 1 -----
int3 1 -----
rev13 1 -----
int2 1 -----
rev11 1 -----
FOR 179 GGAAGGAACCGGATTAAGGACCTATTTAATCCGGACCGTGTCTTATCGGAGGGCGGGAACCCAGAGGGTTTAAAG
231 GGAAGGAACCGGATTAAGGACCTATTTAATCCGGACCGTGTCTTATCGGAGGGCGGGAACCCAGAGGGTTTAAAG
GGAAGGAACCGGATTAAGGACCTATTTAATCCGGACCGTGTCTTATCGGAGGGCGGGAACCCAGAGGGTTTAAAG

for14 1 -----
REV 1
BAB02581 560 CGGTGCAGACTCTCAAGAATGTGTATGCACACTGGGTTCTGAAGGCCAAATCATAACAACCAATCTC-TGGTCTGCTGA
int4 1 -----
for12 1 -----
int3 1 -----
rev13 1 -----
int2 1 -----
rev11 1 -----
FOR 259 CGGTGCAGACTCTCAAGAATGTGTATGCACACTGGGTTCTGAAGGCCAAATCATAACAACCAATCTC-TGGTCTGCTGA
311 CGGTGCAGACTCTCAAGAATGTGTATGCACACTGGGTTCTGAAGGCCAAATCATAACAACCAATCTAATCGTCTGCTGA

for14 1 -----
REV 1
BAB02581 639 GCTGTCCAAGCTTGCGGCAAACGCTTTCTTGGCTCAAAGGATTTCATCAGTGAATGCTATGTCGGCTCT-GTGTGAAGCC
int4 1 -----
for12 1 -----
int3 1 -----
rev13 1 -----
int2 1 -----
rev11 1 -----
FOR 153 GCTGTCCAAGCTTGCGGCAAACGCTTTCTTGGCTCAAAGGATTTCATCAGTGAATGCTATGTCGGCTCT-GTGTGAAGCC
338 GCTGTCCAAGCTTGCTGCAAACGCTTTCTTGGCTCAAAGGATTTCATCAGTGAATGCTATGTCGGCTCT-GTGTGAAGCC
391 GCTGTCCAAGCTTGCGGCAAACGCTTTCTTGGCTCAAAGGATTTCATCAG

for14 1 -----
REV 1
BAB02581 718 ACAGGCGCAGATGTCACGCAAGTGTCTTACGCGGTTGGTACAGACTCAAGGATTGGTCCCAAGTTCTTGAACCTCGAGTGT
int4 1 -----
for12 1 -----
int3 1 -----
rev13 1 -----
int2 1 -----
rev11 1 -----
FOR 55 ACAGGCGCAGATGTCACGCAAGTGTCTTACGCGGTTGGTACAGACTCAAGGATTGGTCCCAAGTTCTTGAACCTCGAGTGT
232 ACAGGCGCAGATGTCACGCAAGTGTCTTACGCGGTTGGTACAGACTCAAGGATTGGTCCCAAGTTCTTGAACCTCGAGTGT
418 ACAGGCGCAGATGTCACGCAAGTGTCTTACG

for14 1 -----
REV 1
BAB02581 798 TGGATTCGGTGGTTGCTGTTTCCAGAAGGACATTCTGAATCTTGTCTACATCTGTGAGTGCAACGGACTCCCGGAAGTGG
int4 1 -----
for12 1 -----
int3 1 -----
rev13 1 -----
int2 1 -----
rev11 1 -----
FOR 32 TGGATTCGGTGGTTGCTGTTTCCAGAAGGACATTCTGAATCTTGTCTACATCTGTGAGTGCAACGGACTCCCGGAAGTGG
135 TGGATTCGGTGGTTGCTGTTTCCAGAAGGACATTCTGAATCTTGTCTACATCTGTGAGTGCAACGGACTCCCGGAAGTGG
312 TGGATTCGGTGGTTGCTGTTTCCAGAAGGACATTCTGAATCTTGTCTACATCTGTGAGTGCAACGGACTCCCGGAAGTGG

```

```

for14      1 -----
REV        1 -----
BAB02581  878 CAGAGTACTGGAAGCAAGTCATCAAGATCAATGACTACCAGAAGAGCCGGTTCGTGAACCGTGTGTTTCTCCATGTTC
int4       1 -----
for12      111 CAGAGTACTGGAAGCAAGTCATCAAGATCAATGACTACCAGAAGAGCCGGTTCGTGAACCGTGTGTTTCTCCATGTTC
int3       215 CAGAGTACTGGAAGCAAGTCATCAAGATCAATGACTACCAGAAGAGCCGGTTCGTGAACCGTGTGTTTCTCCATGTTC
rev13      392 CAGAGTACTGGAAGCAAGTCATCAAGATCAATGACTACCAGAAGAGCCGGTTCGTGAACCGTGTGTTTCTCCATGTTC
int2       -----
rev11      -----
FOR        -----

for14      1 -----
REV        1 -----
BAB02581  958 AACTCTGTATCAAACAAGAAGATTGCGGTTCTCGGTTTCGCATTCAAGAAAGACACCGGTGACACAAGGGAGACTCCAGC
int4       1 -----
for12      192 AACTCTGTATCAAACAAGAAGATTGCGGTTCTCGGTTTCGCATTCAAGAAAGACACCGGTGACACAAGGGAGACTCCAGC
int3       295 AACTCTGTATCAAACAAGAAGATTGCGGTTCTCGGTTTCGCATTCAAGAAAGACACCGGTGACACAAGGGAGACTCCAGC
rev13      472 AACTCTGTATCAAACAAGAAGAT-----
int2       -----
rev11      -----
FOR        -----

for14      1 -----
REV        1 -----
BAB02581  1038 --TCGATGTGTGCAAGGGTCTTTTAGAAGACAAAGCAAGGCTAAGCATTTACGACCCACAAGTGACTGAGGATCAGATCC
int4       1 -----
for12      272 CATCGATGTGTGCAAGGGTCTTTTAGAAGACAAAGCAAGGCTAAGCATTTACGACCCACAAGTGACTGAGGATCAGATCC
int3       375 CATCGATGTGTGCAAGGGTCTTTTAGAAGACAAAGCAAGGCTAAGCATTTACGACCCACAAGTGACTGAGGATCAGATCC
rev13      CATCGATGTGTGCAAGGGTCTTTTAGAAGACAAAGCAAGGCTAAGC-TTTACGACCCACAAGTGACTGAGGATCAG-----
int2       -----
rev11      -----
FOR        -----

for14      79 AGAGGGATTATCCATGAACAAGTTCGACTGGGACCATCCTCTACATTTCAGCCCAATGAGCCCAACAACAGTGAAACAA
REV        27 AGAGGGATTATCCATGAACAAGTTCGACTGGGACCATCCTCTACATTTCAGCCCAATGAGCCCAACAACAGTGAAACAA
BAB02581  118 AGAGGGATTATCCATGAACAAGTTCGACTGGGACCATCCTCTACATTTCAGCCCAATGAGCCCAACAACAGTGAAACAA
int4       1 -----
for12      352 AGAGGGATTATCCATGAACAAGTTCGACTGGGACCATCCTCTACATTTCAGCCCAATGAGCCCAACAACAGTGAAACAA
int3       -----
rev13      -----
int2       -----
rev11      -----
FOR        -----

for14      159 GTGACCGTTACTTGGGACGCATACGAAGCAACTAAGGACGCTCACGGTATCTGCATCATGACCGAGTGGGATGAGTTCAA
REV        107 GTGACCGTTACTTGGGACGCATACGAAGCAACTAAGGACGCTCACGGTATCTGCATCATGACCGAGTGGGATGAGTTCAA
BAB02581  1198 GTGACCGTTACTTGGGACGCATACGAAGCAACTAAGGACGCTCACGGTATCTGCATCATGACCGAGTGGGATGAGTTCAA
int4       1 -----
for12      432 GTGACCGTTACTTGGGACGCATACGAA-----CAACTAAGGACGCTCACGGTATCTGCATCATGACCGAGTGGGATGAGTTCAA
int3       -----
rev13      -----
int2       -----
rev11      -----
FOR        -----

for14      239 GAACCTTGATTTCCAGAAGATCTTTGACAACATGCAGAAACCAGCTTTCGTGTTTCGATGGAAGAAACATTATGAATCTGC
REV        187 GAACCTTGATTTCCAGAAGATCTTTGACAACATGCAGAAACCAGCTTTCGTGTTTCGATGGAAGAAACATTATGAATCTGC
BAB02581  1278 GAACCTTGATTTCCAGAAGATCTTTGACAACATGCAGAAACCAGCTTTCGTGTTTCGATGGAAGAAACATTATGAATCTGC
int4       53 GAACCTTGATTTCCAGAAGATCTTTGACAACATGCAGAAACCAGCTTTCGTGTTTCGATGGAAGAAACATTATGAATCTGC
for12      -----
int3       -----
rev13      -----
int2       -----
rev11      -----
FOR        -----

for14      319 AAAAGCTAAGGGAGATTGGTTTCATTGTTTACTCCATTGGTAAGCCTCTCGACGACTGGCTCAAGGACATGCGCTGCCCT
REV        267 AAAAGCTAAGGGAGATTGGTTTCATTGTTTACTCCATTGGTAAGCCTCTCGACGACTGGCTCAAGG-ACATGCGCTGCCCT
BAB02581  1358 AAAAGCTAAGGGAGATTGGTTTCATTGTTTACTCCATTGGTAAGCCTCTCGACGACTGGCTCAAGG-ACATGCGCTGCCCT
int4       133 AAAAGCTAAGGGAGATTGGTTTCATTGTTTACTCCATTGGTAAGCCTCTCGACGACTGGCTCAAGG-ACATGCGCTGCCCT
for12      -----
int3       -----
rev13      -----
int2       -----
rev11      -----
FOR        -----

for14      399 TGCCTAA
REV        346 TGCCTAA
BAB02581  1437 TGCCTAA
int4       212 TGCCTAA
for12      -----
int3       -----
rev13      -----
int2       -----
rev11      -----
FOR        -----

```

Figure 14b : Alignement de la séquence nucléotidique de référence d'UDP-gldh (BAB02581) avec les séquences obtenues à l'aide des amorces internes spécifiques (int2,int3,int4 et rev11,rev13,for12 et for14) et des amorces universelles M13 Forward (FOR) et Reverse (REV), utilisées pour reconstituer la séquence du gène d'UDP-gldh cloné.

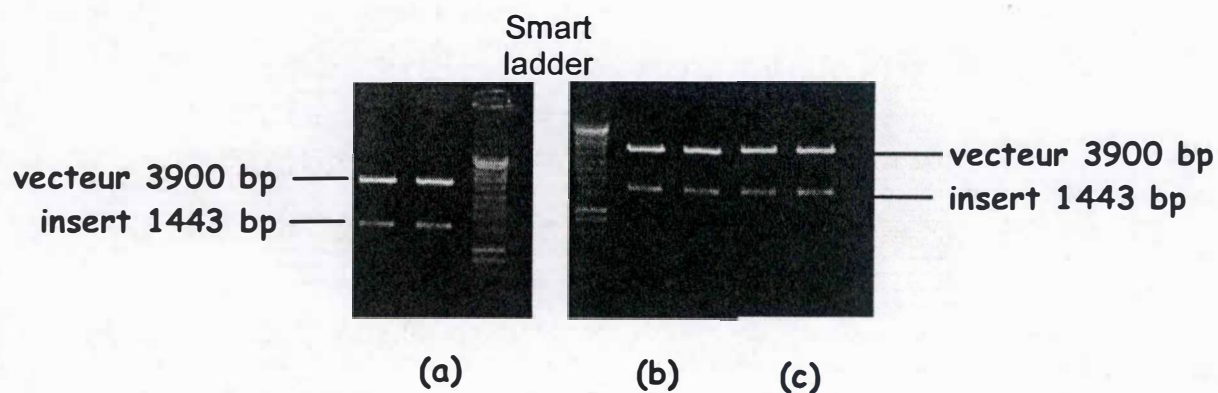


Figure 15a : Restriction de 2 préparations d'ADN plasmidique pCRII-UDP-gldh (au départ de la colonie 10) avec les enzymes EcoRI seul (a); NotI seul (b); EcoRI et NotI ensemble (c)

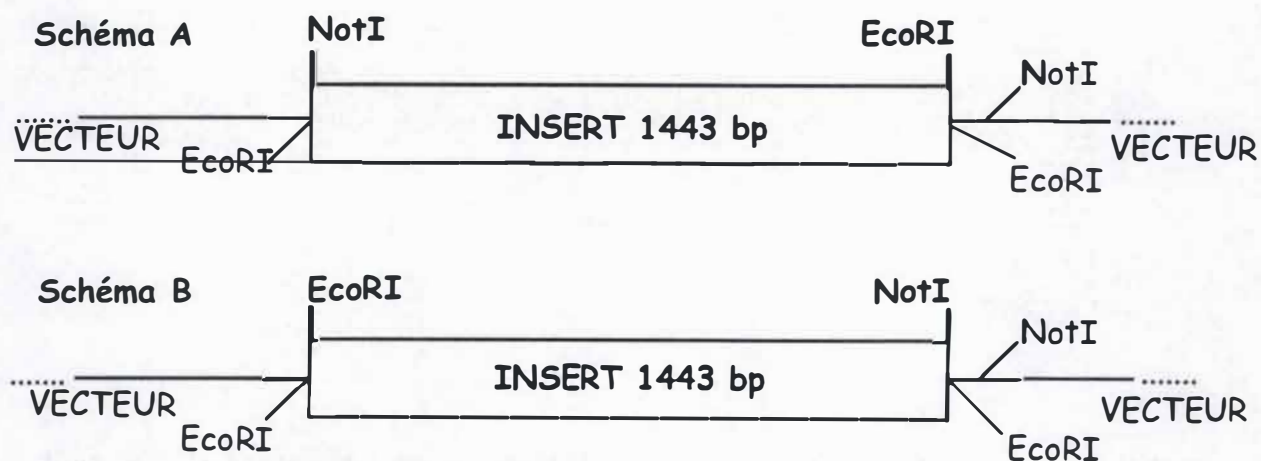


Figure 15b : Orientations possibles de l'insert correspondant au gène codant pour l'UDP-gldh dans le vecteur pCRII.

utilisées sont présentées à la Figure 14b, alignées à la séquence nucléotidique de référence. Il est à noter que les logiciels employés pour nos alignements n'ont permis de comparer que 9 séquences sur 10 à la séquence de référence : nous avons choisi de retirer les résultats obtenus avec l'amorce «int 1», confirmant dans le sens 3' → 5' la séquence obtenue avec FOR 1 (5' → 3').

Sur les 9 variations de séquences observées, une seule s'est avérée être significative : la présence d'une guanine à la position 1435 de la séquence de référence, qui devient une cytosine dans la séquence clonée (confirmée par trois séquences différentes). Les autres variations correspondent à des artéfacts de séquençage obtenus pour une séquence donnée, mais non confirmées par les autres séquences recouvrant les mêmes zones. La traduction en acides aminés de la séquence clonée (DNA strider 1.2) montre que le changement de base provoque un changement d'acide aminé : une valine (V) en position 479 devient une leucine (L). Trois hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette divergence d'un nucléotide entre la séquence clonée et celle de référence :

- 1° cette différence résulterait d'une erreur de séquençage présente dans la séquence de référence publiée dans les banques de données ;
- 2° cette variation pourrait correspondre à du SNP's : Single Nucleotide Polymorphism puisque l'on constate une variabilité plus élevée des séquences à cet endroit ;
- 3° ce changement de base pourrait avoir été introduit par l'amorce dégénérée utilisée pour l'amplification du gène par PCR.

Il est toutefois possible que d'autres produits PCR correspondant à d'autres séquences d'UDP-gldh aient été amplifiés à partir du cDNA d'*Arabidopsis* mais nous n'avons pas fait de la recherche de ces isoformes une priorité dans notre travail, étant donné la forte conservation des séquences d'UDP-gldh. Les banques de données font état de l'existence d'un autre gène correspondant à une UDP-gldh d'*Arabidopsis* (BAB11006), présent cette fois sur le chromosome 5. Il existe donc au moins deux gènes codant pour des isoformes d'UDP-gldh chez *Arabidopsis*, ce qui va à l'encontre des résultats de Seitz *et al.* (2000) qui, en alignant des EST d'*Arabidopsis* trouvés dans les banques de données sont arrivés à la conclusion de la présence d'un seul gène d'UDP-gldh chez ce végétal!

Avant de passer au sous-clonage du gène codant pour l'UDP-gldh dans le vecteur d'expression, de l'ADN plasmidique pCRII-UDP-gldh a été restreint avec les enzymes EcoRI et NotI, isolées ou combinées, afin de déterminer l'orientation de l'insert dans le vecteur

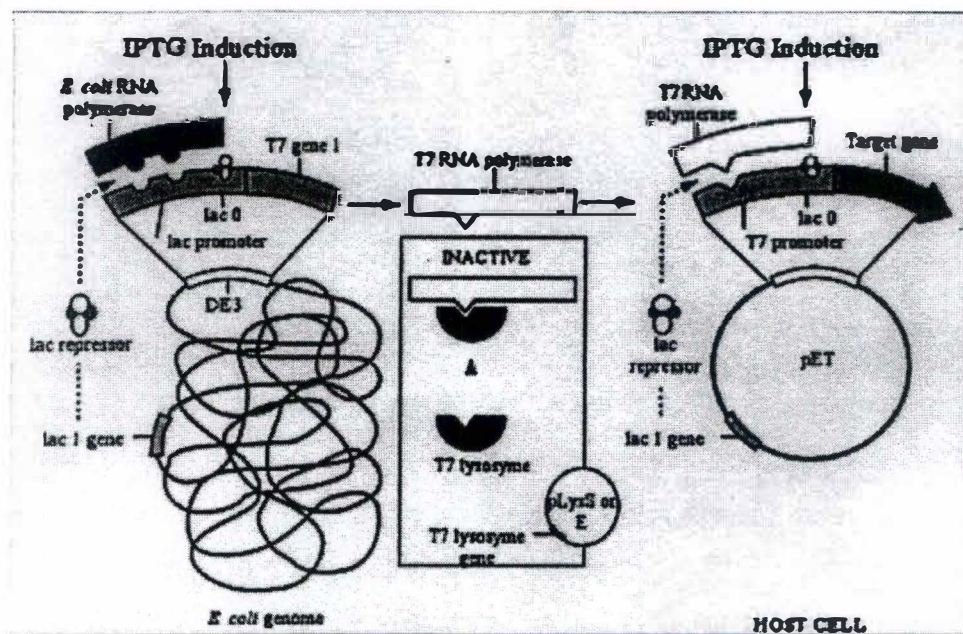


Figure 16 : Principe de l'expression en pET

pCRII. Les résultats de ces restrictions sont montrés sur la Figure 15a, où nous présentons également les deux orientations possibles des inserts (Figure 15b). Le pattern de restriction indique que l'insert est orienté selon le schéma A puisque l'on peut observer le retrait de l'insert en clivant avec NotI seul alors que cela ne serait pas possible si ce dernier était orienté selon le schéma B, le clivage avec NotI ne permettant dans ce cas que de linéariser la construction. Ces vérifications terminées, nous avons pu passer à l'étape suivante : le sous-clonage du gène codant pour une UDP-gldh dans un vecteur d'expression, pET 17b.

5. LE SOUS-CLONAGE DE L'UDP-GLDH DANS UN VECTEUR D'EXPRESSION

5.1 Principe de l'expression en pET

Dans les vecteurs de la lignée pET (Figure 16), vecteurs développés par la société Novagen pour l'expression de protéines recombinantes en *E.coli*, les gènes d'intérêt sont clonés sous le contrôle du promoteur du bactériophage T7, qui n'est pas reconnu par l'ARN polymérase d'*E. coli*. L'expression protéique n'est normalement induite que lorsque l'on fournit de l'ARN polymérase T7 à la bactérie hôte. Les gènes clonés dans les vecteurs pET sont donc virtuellement «off».

Il est possible dans le système pET de contrôler le niveau d'ARN polymérase T7 et de ce fait la transcription des gènes cibles en modifiant le type de souches bactériennes et/ou de vecteur utilisé. Les plasmides recombinants sont transférés dans des bactéries, comme les BL21DE3, contenant dans leur génome le gène codant pour l'ARN polymérase T7, lui-même sous le contrôle d'un promoteur *lacUV5* inductible par l'IPTG (isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside). L'ajout d'IPTG à une suspension de bactéries BL21DE3 transformées et en période de croissance active, (DO_{600nm} comprise entre 0,4 et 0,6), induit la production par ces bactéries hôtes d'ARN polymérase T7 qui, à son tour, réalise la transcription du gène cloné dans le vecteur. La sélectivité et l'activité de l'ARN polymérase T7 sont telles que la plupart des ressources de l'hôte sont utilisées pour l'expression, la protéine cible peut représenter plus de 50% des protéines cellulaires totales après quelques heures d'incubation.

Toutefois le contrôle de l'ARN polymérase T7 par le promoteur *lacUV5* n'est pas total et de ce fait un peu d'ARN polymérase T7 est tout de même produit par les bactéries. Cet

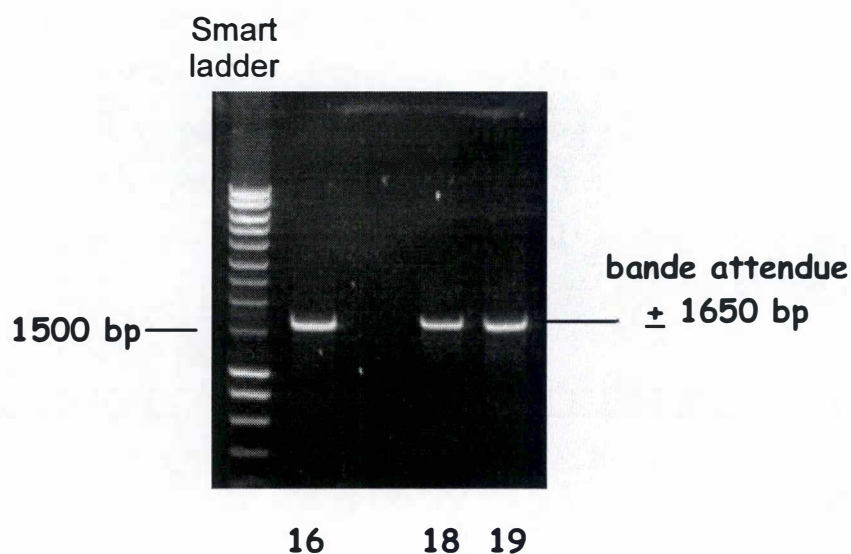


Figure 17 : Identification par PCR sur colonies à l'aide d'amorces universelles T7, des bactéries TOP 10 transformées avec le vecteur recombinant pET 17b-UDP-gldh

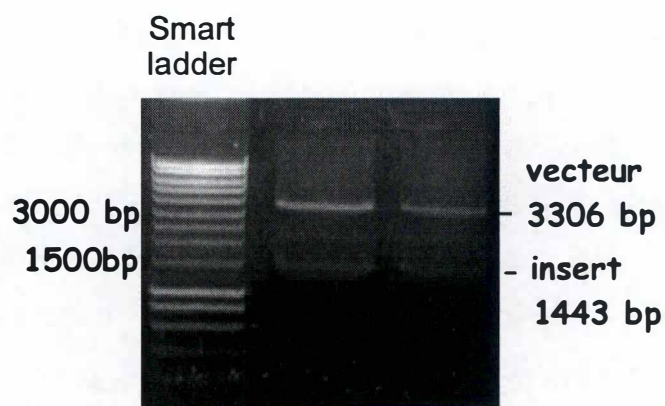


Figure 18a : Restriction EcoRI-NotI de l'ADN plasmidique pET 17b-UDP-gldh (échantillon 19)

ARN polymérase T7 est responsable de l'existence d'un niveau basal d'expression du gène cible en l'absence de toute induction. D'autres types de bactéries permettent quant à elles des contrôles plus stricts des niveaux d'expression : les plasmides pLys contenus dans des souches comme BL21DE3 pLys contiennent un gène codant pour le lysozyme T7, inhibiteur naturel de l'ARN polymérase T7, ce qui limite la capacité de cette enzyme à transcrire les gènes cibles clonés en absence d'induction par l'IPTG.

En pratique, les vecteurs pET recombinants sont d'abord utilisés pour la transformation de bactéries ne contenant le gène de l'ARN polymérase T7, afin d'éliminer l'instabilité plasmidique due à la production de protéines pouvant éventuellement s'avérer toxiques pour la bactérie hôte. Suite à cette stabilisation dans un hôte ne permettant pas l'expression protéique, comme c'est le cas des bactéries *E.coli* TOP10, les plasmides sont alors transférés dans une souche autorisant l'expression des protéines codées par les gènes clonés, c'est le cas des bactéries BL21DE3. Nous avons choisi dans le cadre de ce travail d'utiliser le vecteur pET 17b comme vecteur d'expression (voir partie Matériel et Méthodes, Figure 8) et avons envisagé de tester deux souches de bactéries, les BL21DE3 et, BL21DE3 star qui produisent moins de protéases encore que les précédentes, et pourraient donc être susceptibles d'exprimer la protéine cible en quantité encore plus importante que les BL21DE3.

5.2 Le clonage

De l'ADN plasmidique correspondant aux vecteurs pCRII-UDP-gldh et pET 17b ont été restreints avec les enzymes EcoRI et NotI. Les bandes correspondant à l'UDP-gldh et au vecteur pET 17b ont été excisées du gel d'agarose pour ensuite être purifiées et quantifiées dans le but d'optimiser la réaction de ligation de l'insert UDP-gldh dans le vecteur d'expression pET 17b. Le gène de l'UDP-gldh est inséré dans le vecteur pET 17b en phase et après une séquence codant pour un petit peptide, dénommé T7tag. Ce tag est fusionné à la protéine lorsque celle-ci est produite par les bactéries. Le produit de ligation obtenu a servi à transformer des souches bactériennes TOP10. Les bactéries positives, c'est à dire contenant le vecteur recombinant pET 17b-UDP-gldh, ont été identifiées par PCR sur colonies à l'aide des amorces universelles T7 promoteur et T7 terminateur spécifiques de la séquence du vecteur. Le criblage a été réalisé sur 50 colonies dont 8 se sont avérées être positives. La Figure 17

```

1/1                               31/11
ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT TCA AGC TTG GTA CCT AGC TCT
M  A  S  M  T  G  G  Q  Q  M  G  R  D  S  S  L  V  P  S  S
61/21                               91/31
GAT CCA CTA GTA ACG GCC GCC AGT GTG CTG GAA TTC ATG GTG AAG ATA TGT TGT ATT GGA
D  P  L  V  T  A  A  S  V  L  E  F  M  V  K  I  C  C  I  G
121/41                               151/51
GCT GGG TAT GTT GGT GGA CCA ACA ATG GCA GTG ATT GCA TTG AAA TGT CCA GAC GTT GAA
A  G  Y  V  G  G  P  T  M  A  V  I  A  L  K  C  P  D  V  E
181/61                               211/71
GTA GCG GTT GTT GAT ATC TCT GTA CCA CGT ATC AAC GCT TGG AAC AGT GAC ACG CTT CCG
V  A  V  V  D  I  S  V  P  R  I  N  A  W  N  S  D  T  L  P
241/81                               271/91
ATT TAC GAG CCT GGT CTT GAT GAT GTT GTG AAG CAA TGC CGT GGC AAG AAC CTT TTC TTT
I  Y  E  P  G  L  D  D  V  V  K  Q  C  R  G  K  N  L  F  F
301/101                               331/111
AGT ACT GAT GTT GAG AAA CAT GTT AGG GAA GCT GAT ATT GTG TTT GTT TCT GTC AAC ACA
S  T  D  V  E  K  H  V  R  E  A  D  I  V  F  V  S  V  N  T
361/121                               391/131
CCG ACT AAG ACT AGA GGT CTT GGT GCT GGT AAA GCT GCG GAT CTT ACG TAC TGG GAG AGC
P  T  K  T  R  G  L  G  A  G  K  A  A  D  L  T  Y  W  E  S
421/141
GCT GCG CGT
A  A  R

```

Figure 18b : Vérification de la conservation de la phase de lecture entre le T7tag et l'UDP-gldh clonée dans pET 17b (surlignage bleu : T7tag; vert : site de clonage EcoRI; jaune : ATG de l'UDP-gldh)

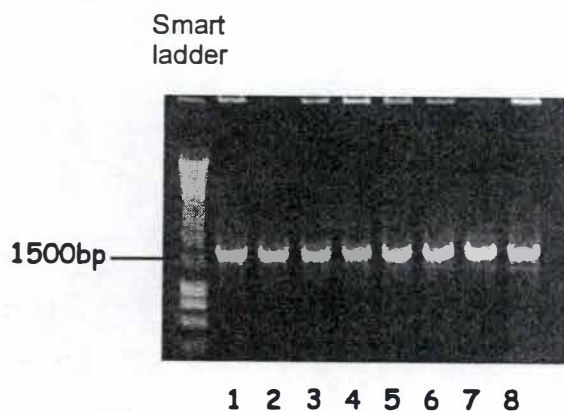


Figure 19 : Identification par PCR sur colonies à l'aide d'amorces universelles, des bactéries BL21DE3 transformées avec la préparation d'ADN plasmidique pET 17b-UDP-gldh

montre 3 de ces colonies positives, où l'amplification PCR a donné lieu à des produits d'environ 1650 bp.

Des préparations d'ADN plasmidique ont été effectuées à partir de cultures liquides des bactéries positives contenant le vecteur pET 17b-UDP-gldh. Une digestion de ces ADN ainsi obtenus a été réalisée à l'aide des enzymes de restriction EcoRI et NotI, permettant de confirmer la présence d'un vecteur recombinant pET 17b-UDP-gldh dans ces bactéries. Comme l'illustre la Figure 18a, ce clivage permet la visualisation de deux bandes, l'une correspondant au vecteur (3806 bp), l'autre à l'insert (1443 bp). Le respect de la phase de lecture suite au sous-clonage a été vérifié par séquençage du produit PCR correspondant à la colonie 19 en utilisant l'amorce T7 promoteur spécifique de la séquence du vecteur (Figure 18b). Le poids moléculaire théorique de la protéine de fusion exprimée (calculé via DNA strider 1.2) est de 56,4 kDa.

Tous ces contrôles réalisés, nous avons pu effectuer le transfert du vecteur recombinant pET 17b-UDP-gldh dans des bactéries permettant l'expression de la protéine d'intérêt.

6. EXPRESSION DE LA PROTEINE D'INTERET PAR DES BACTERIES BL21DE3

Le transfert des vecteurs pET17b-UDP-gldh dans des bactéries destinées à l'expression, les BL21DE3, a été réalisé par transformation de ces bactéries avec une préparation d'ADN plasmidique (échantillon 19). L'efficacité de la transformation de ces bactéries est montré à la Figure 19, où des fragments de taille attendue d'environ 1700 bp ont été obtenus suite à une amplification par PCR sur colonies résultant de la transformation, en utilisant les amorces T7 promoteur et T7 terminateur spécifiques de la séquence du vecteur pET17b.

Le même travail a été effectué avec des bactéries BL21DE3 star. Nous avons également procédé à la transformation de bactéries BL21DE3 avec le vecteur pET17b ne contenant pas d'insert. Des extraits protéiques issus de cultures liquides de ces bactéries ont servi de contrôle lors des expériences d'expression de l'UDP-gldh en bactéries.

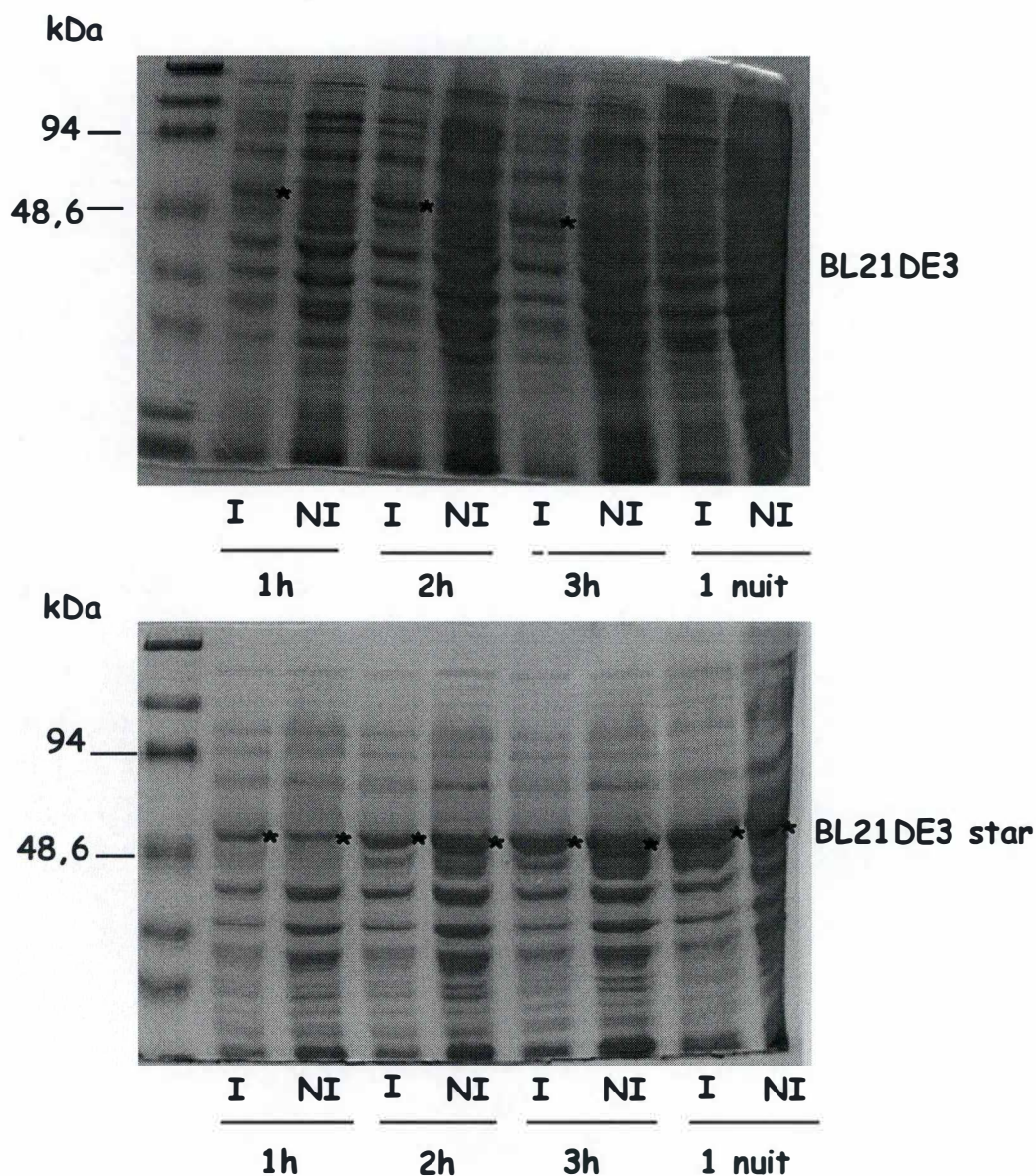


Figure 20 : Cinétique d'expression de l'UDP-gldh d'*Arabidopsis thaliana* en *E. coli*.

Analyse en gel SDS-PAGE 10% après coloration au bleu de Coomassie des protéines totales extraites au départ de bactéries BL21DE3 et BL21DE3 star contenant le vecteur pET 17b-UDP-gldh cultivées en présence (I) ou en absence (NI) d'IPTG pendant 1h-2h-3h-1 nuit

* bande attendue à 56,4 kDa

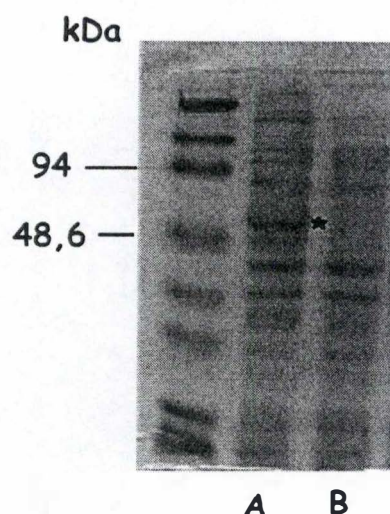


Figure 21 : Surexpression d'UDP-gldhd d'*Arabidopsis thaliana* en *E. coli*.

Analyse sur gel SDS-PAGE 10% après coloration au bleu de Coomassie, des protéines totales extraites au départ de BL21DE3 cultivées en présence d'IPTG pendant 3h et contenant soit le vecteur recombinant pET 17b-UDP-gldh (A), soit le vecteur pET 17b sans insert (B)

* bande attendue 56,4 kDa

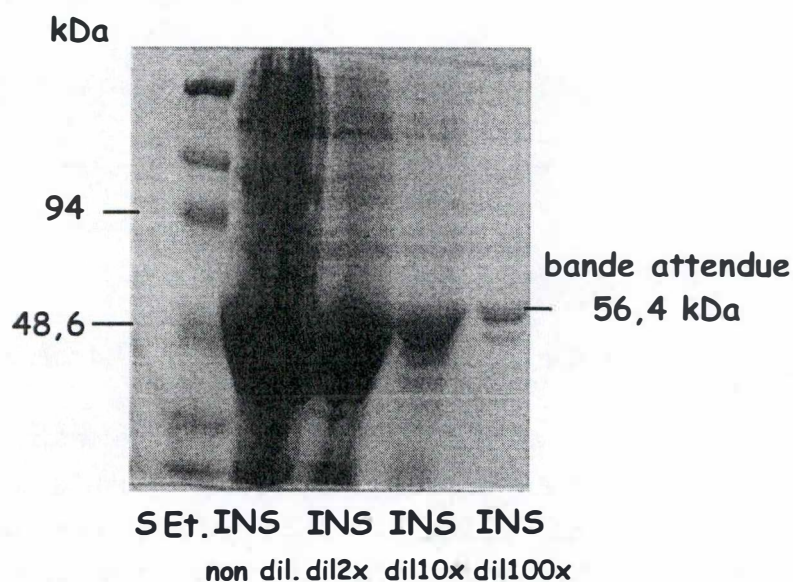


Figure 22 : Analyse en gel SDS-PAGE 8% après coloration au bleu de Coomassie des protéines solubles (S) et insolubles (INS) extraites au départ de bactéries BL21DE3 (culture de 1l.) contenant le vecteur pET 17b-UDP-gldh et cultivées pendant 3h en présence d'IPTG

Des petites cultures de bactéries transformées ont permis d'établir les conditions optimales de l'expression de l'UDP-gldh en bactérie. La production de la protéine d'intérêt a été visualisée par une analyse en électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), après une coloration au bleu de Coomassie, d'extraits protéiques préparés à partir de cultures de bactéries transformées. La Figure 20 montre une comparaison de l'expression d'UDP-gldh recombinante par des bactéries BL21DE3 et BL21DE3 star contenant pET 17b-UDP-gldh. Nous pouvons constater que la protéine d'intérêt, d'un poids moléculaire estimé de 56,4 kDa est bien produite par les bactéries BL21DE3 contenant pET 17b-UDP-gldh, après 1 h, 2 h et 3 h d'induction à l'IPTG. Aucune bande protéique correspondant à ce poids moléculaire n'est visible dans les extraits protéiques préparés à partir des mêmes bactéries cultivées durant des périodes identiques mais dont l'expression de la protéine cible n'a pas été induite par l'IPTG. La présence de la protéine cible est difficilement détectable dans les extraits préparés à partir des bactéries cultivées en présence d'IPTG pendant une nuit. Les BL21DE3 star, transformées avec le vecteur pET 17b-UDP-gldh, présentent une surexpression de la protéine cible indépendante de la présence d'IPTG dans le milieu de culture. Pour des cultures de 2 et 3 h, l'UDP-gldh recombinante est même produite de manière plus importante par les bactéries en absence d'IPTG. Ces bactéries ont un niveau basal d'expression plus important que celui observé dans le cas des BL21DE3. La Figure 21 confirme la spécificité de l'expression d'UDP-gldh recombinante par les bactéries BL21DE3 transformées par pET 17b-UDP-gldh. En effet, les extraits protéiques préparés au départ de ces bactéries contiennent une bande protéique surexprimée de 56,4 kDa alors qu'une bande d'une telle intensité n'est pas observée dans les extraits effectués au départ de BL21DE3 contrôles, transformées avec le vecteur sans insert (Figure 21).

7. PURIFICATION DE L'UDP-GLDH RECOMBINANTE

Une grande culture de BL21DE3 transformées avec le vecteur pET 17b-UDP-gldh a été effectuée afin de constituer un stock suffisant d'UDP-gldh pour les manipulations ultérieures. Comme le montre la Figure 22, l'UDP-gldh recombinante est exprimée par les bactéries sous forme insoluble, présente dans des corps d'inclusion. Aucune présence significative de cette protéine n'a été détectée dans la fraction des protéines solubles préparée au départ de cette grande culture. Il est à noter que nous avons comparé les schémas de migration des extraits protéiques sur des gels SDS-PAGE de 10 % et 8 %. Ce dernier

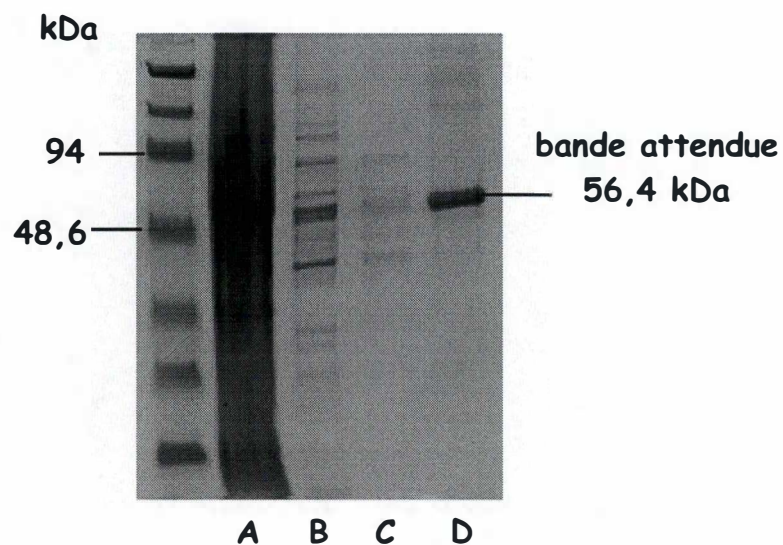


Figure 23 : Purification d'une UDP-gldh recombinante exprimée en *E. coli* par chromatographie d'affinité.
Analyse sur gel SDS-PAGE 8% après coloration au bleu de Coomassie des échantillons suivants :

- (A) protéines totales extraites à partir de 500 μ l de la culture bactérienne utilisée
- (B) protéines totales diluées dans de l'urée 6M
- (C) protéines non retenues par la colonne (flow through)
- (D) protéines éluées et concentrées

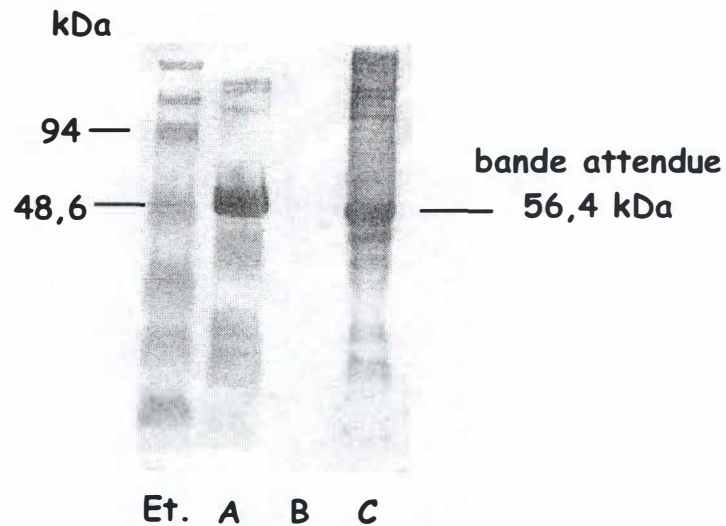


Figure 24 : Mise en évidence de l'UDP-gldh recombinante dans des extraits protéiques (A),(B),(C) analysés en western-blot et marqués avec l'anticorps anti-T7 tag

- (A) extrait protéique issu de la fraction insoluble (dil 100x) d'une grande culture de BL21DE3 transformées avec le vecteur pET 17b-UDP-gldh (induites 3h à l'IPTG)
- (B) extrait protéique brut préparé à partir de BL21DE3 transformées avec le vecteur pET 17b sans insert (induites 3h à l'IPTG) (contrôle négatif)
- (C) protéine UDP-gldh purifiée par chromatographie d'affinité avec une colonne d'anticorps anti T7-tag

pourcentage permettant une meilleure séparation des composants des échantillons, nous avons poursuivi la suite des expériences en travaillant avec des gels SDS-PAGE 8 %.

Les extraits protéiques réalisés au départ des corps d'inclusion ont été déposés sur grand gel SDS-PAGE en vue de la purification des protéines cibles par électro-élution. Cette dernière ne donnant pas de résultats probants, nous avons procédé à la purification de l'UDP-gldh recombinante par chromatographie d'affinité. Pour rappel, l'UDP-gldh produite est une protéine de fusion, à laquelle est attaché un petit peptide, le T7tag. Le kit «T7tag affinity purification» (Novagen) est basé sur l'interaction spécifique de la protéine de fusion cible, l'UDP-gldh-T7tag, avec un anticorps anti-T7tag immobilisé sur une résine de chromatographie. Grâce à l'utilisation de ce kit, nous avons obtenu, au départ d'une culture de 100 ml de bactéries, plusieurs éluats qui, après concentration, ont été analysés sur gel SDS-PAGE. La Figure 23 montre l'efficacité de cette approche qui nous a permis d'isoler de l'UDP-gldh recombinante. La quantité de protéines purifiées déposées dans les puits d'un gel SDS-PAGE a été déterminée par dosage protéique: elle est de 5,9 µg.

La présence d'un T7tag fusionné à l'UDP-gldh produite par les bactéries a également été vérifiée par Western-blot. Des extraits contenant ou non de l'UDP-gldh recombinante ont été mis à migrer sur un gel SDS-PAGE. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose et incubées avec un anticorps anti-T7tag couplé à une enzyme. La Figure 24 montre clairement que dans les extraits de protéines insolubles préparés à partir de BL21DE3 contenant pET 17-UDP-gldh (Figure 24 A), la bande protéique majoritaire reconnue par l'anticorps correspond au poids moléculaire calculé de 56,4 kDa de l'UDP-gldh recombinante. Comme attendu, une bande de poids moléculaire identique est reconnue par l'anticorps dans la fraction protéique purifiée (Figure 24 C), alors qu'aucune protéine n'est détectée dans les extraits préparés au départ de bactéries contenant le vecteur pET 17b sans insert (en B).

Notons toutefois que le peptide T7tag est produit par les bactéries transformées avec le vecteur sans insert, mais le pourcentage du gel de polyacrylamide que nous utilisons (8%) ne permet pas sa mise en évidence. Nous pouvons donc conclure à ce stade de notre travail que nous avons cloné et exprimé en bactéries le gène codant pour une UDP-gldh d'*Arabidopsis thaliana*. La phase suivante de nos manipulations consistera à démontrer que les anticorps des

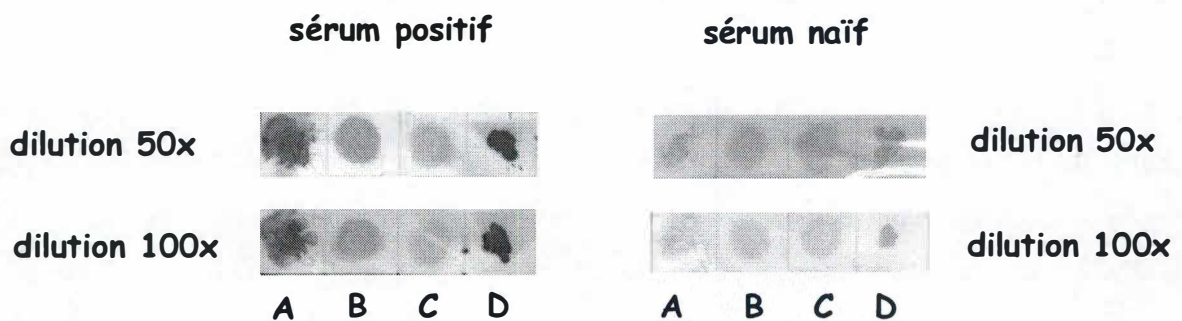


Figure 25 : Test dot-blot : Réactivité du polysérum de lapin immunisé avec le mélange de peptides spécifiques de l'UDP-gldh vis-à-vis de (A) mélange de peptides couplés à la KLH (B) l'UDP-gldh recombinante purifiée (C) préparation protéique totale préparée à partir de BL21DE3 transformées avec le vecteur pET17b sans insert (D) un polysaccharide couplé à la KLH
Contrôle : sérum du lapin avant immunisation

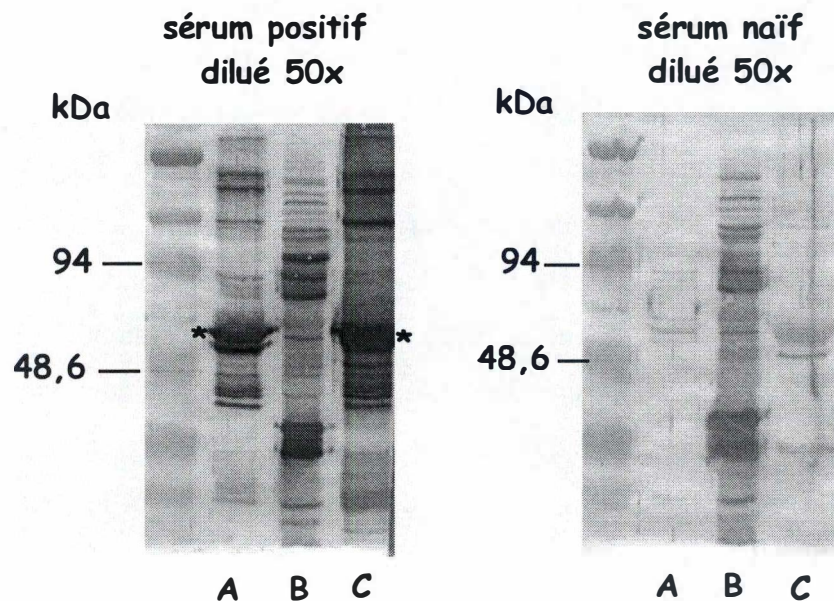


Figure 26 : Détection de l'UDP-gldh dans des extraits protéiques analysés en western-blot et marqués avec le sérum du lapin immunisé et le sérum naïf

- (A) extrait protéique issu de la fraction insoluble (dil100x) d'une grande culture de BL21DE3 transformées avec le vecteur pET 17b-UDP-gldh
- (B) extrait protéique brut préparé à partir de BL21DE3 transformées avec le vecteur pET 17b sans insert induit 3h à l'IPTG
- (C) protéine UDP-gldh recombinante purifiée

*bande attendue 56,4 kDa

animaux immunisés avec des peptides sont bien capables de reconnaître cette UDP-gldh recombinante.

8. CARACTERISATION DES REPONSES ANTI-PEPTIDES D'UDP-GLDH

8.1 Dot-blots et Western-blots

Les réponses des animaux immunisés avec les deux peptides dérivés de la séquence d'une UDP-gldh d'*Arabidopsis thaliana* couplés à la KLH ont été analysées par des tests de type dot-blot et Western-blots.

La Figure 25 montre les résultats obtenus avec le polysérum du lapin immunisé, analysé en dot-blot. Ce test est basé sur la reconnaissance d'un antigène, immobilisé sur un support solide, par des anticorps primaires spécifiques eux-mêmes détectés par des anticorps secondaires couplés à une enzyme. On peut y voir que le sérum de l'animal immunisé (sérum positif) montre une réponse significative sur l'UDP-gldh recombinante purifiée (B), réponse nettement supérieure à celle obtenue sur l' extrait ne contenant pas cette protéine (C). Comme attendu, le mélange de peptides couplés à la KLH est fortement reconnu par ce sérum (A) mais un polysaccharide végétal couplé à la KLH l'est tout autant, si même pas plus (D), ce qui indique qu'une partie importante de la réponse immunitaire du lapin est dirigée contre la KLH.

Le sérum du lapin avant immunisation (sérum naïf), qui sert de contrôle dans cette expérience, montre une réponse «basale» pratiquement équivalente sur tous les antigènes testés. Des extraits ne contenant pas d'UDP-gldh (antigène C) sont reconnus avec la même intensité par le sérum naïf et le sérum positif alors que, dans le cas des antigènes A, B et D contenant de l'UDP-gldh, la réponse du sérum naïf est nettement inférieure à celle obtenue avec le sérum positif, ce qui atteste de la spécificité de ce dernier.

De manière plus précise, la reconnaissance de la protéine cible par des anticorps primaires spécifiques a également été vérifiée en Western-blot. On peut voir sur la Figure 26 que le sérum positif reconnaît bien une bande protéique correspondant à de l'UDP-gldh recombinante, identifiée par son poids moléculaire attendu de 56.4 kDa, commune aux

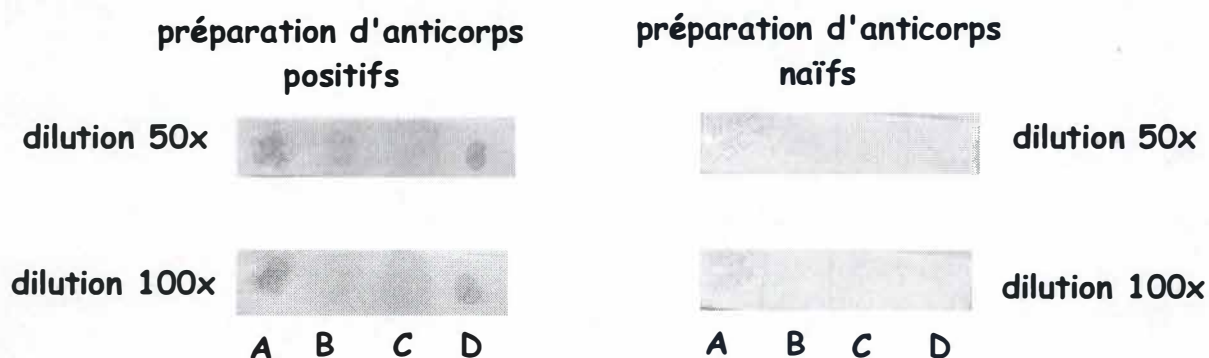


Figure 27 : Test dot-blot : Réactivité des anticorps préparés à partir d'un oeuf de poule immunisée avec le mélange de peptides spécifiques de l'UDP-gldh, vis-à-vis de (A) mélange de peptides couplés à la KLH
(B) l'UDP-gldh recombinante purifiée
(C) préparation protéique totale préparée à partir d'*E.coli* transformées avec le vecteur pET 17b sans insert
(D) un polysaccharide couplé à la KLH
Contrôle : Anticorps isolés à partir d'un oeuf de poule avant immunisation

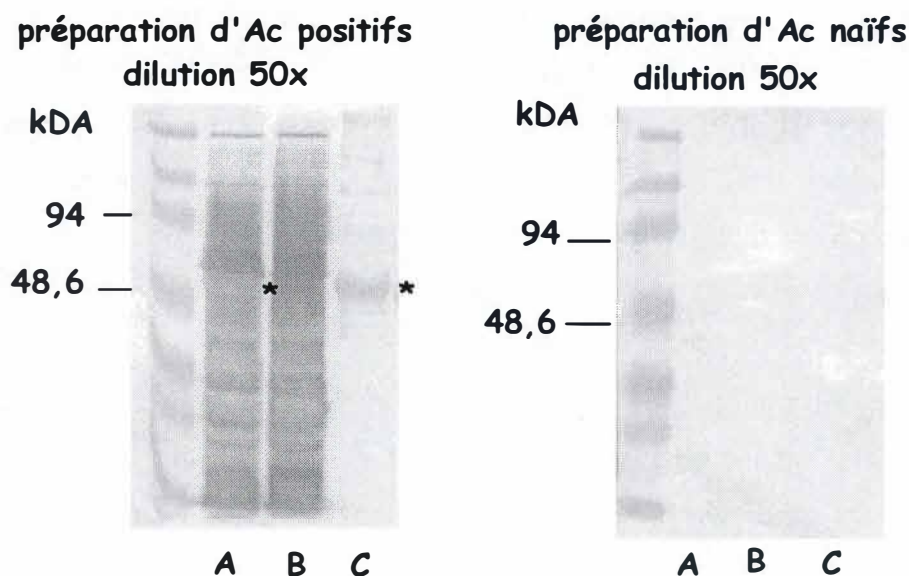


Figure 28 : Détection de l'UDP-gldh dans des extraits protéiques analysés en Western-blot et marqués avec les anticorps isolés à partir d'un oeuf récolté avant et après immunisation de la poule.
(A) extrait protéique issu de la fraction insoluble (dil100x) d'une grande culture de BL21DE3 transformées avec le vecteur pET 17b-UDP-gldh
(B) extrait protéique brut préparé à partir de BL21DE3 transformées avec le vecteur pET 17b sans insert induit 3h à l'IPTG
(C) protéine UDP-gldh recombinante purifiée
* bande attendue 56,4 kDa

extraits protéiques insolubles (A), préparés à partir de bactéries contenant la construction pET 17b-UDP-gldh, et à la fraction d'UDP-gldh recombinante purifiée (C). Aucune bande protéique de poids moléculaire similaire n'est reconnue par ce sérum positif dans l'extrait de protéines totales préparées à partir de bactéries qui ne produisent pas d'UDP-gldh recombinante (B). Le sérum naïf ne montre pas de fixation significative sur la bande correspondant à l'UDP-gldh (A et C), confirmant les résultats obtenus précédemment en dot-blot (Figure 25). Il présente cependant un bruit de fond élevé vis-à-vis de protéines de *E. coli*, extraites au départ de bactéries contenant le vecteur pET 17b seul (B). Cette réponse vis-à-vis de protéines de *E. coli* est toujours présente dans le cas du sérum positif testé contre la même préparation. Des protéines de poids moléculaire soit plus élevé, soit plus faible que celui de l'UDP-gldh, présentes dans les échantillons A et C, sont également reconnues par le sérum positif. Ces protéines pourraient correspondre soit à des multimères ou agrégats d'UDP-gldh (pour les poids moléculaires élevés) ou soit à des produits de dégradation ou de synthèses incomplètes (en ce qui concerne les faibles poids moléculaires).

La caractérisation de la réponse anti-UDP-gldh développée par la poule immunisée a été effectuée comme décrit précédemment pour le lapin. Une préparation d'anticorps a été effectuée au départ d'un œuf récolté avant immunisation de la poule et d'un œuf récolté une semaine après le premier rappel. En observant les résultats obtenus sur la Figure 27, on constate que, contrairement à ce qui a été observé chez le lapin, les anticorps préparés à partir d'un œuf de la poule immunisée (préparation d'anticorps positifs) répondent d'une manière à peu près similaire sur l'UDP-gldh recombinante purifiée (B) et sur une préparation protéique ne contenant pas d'UDP-gldh (C)! Comme attendu, ces anticorps de poule reconnaissent le mélange de peptides couplés à la KLH (A) mais également le polysaccharide couplé à la KLH (D), suggérant une fois de plus que la réponse immunitaire de l'animal est principalement dirigée contre la KLH. Aucune réponse significative vis-à-vis des quatre antigènes testés n'a été observée avec les anticorps naïfs, préparés à partir d'un œuf récolté avant immunisation de la poule.

Les résultats du Western-blot, montrés en Figure 28, permettent de confirmer le peu de différences observées en dot-blot entre la reconnaissance, par les anticorps, de la préparation de protéines contenant de l'UDP-gldh (A) et celle n'en contenant pas (B). La bande protéique correspondant à l'UDP-gldh recombinante, présente dans les extraits de protéines insolubles préparés à partir de bactéries contenant pET 17b-UDP-gldh (A), est bien détectée par la

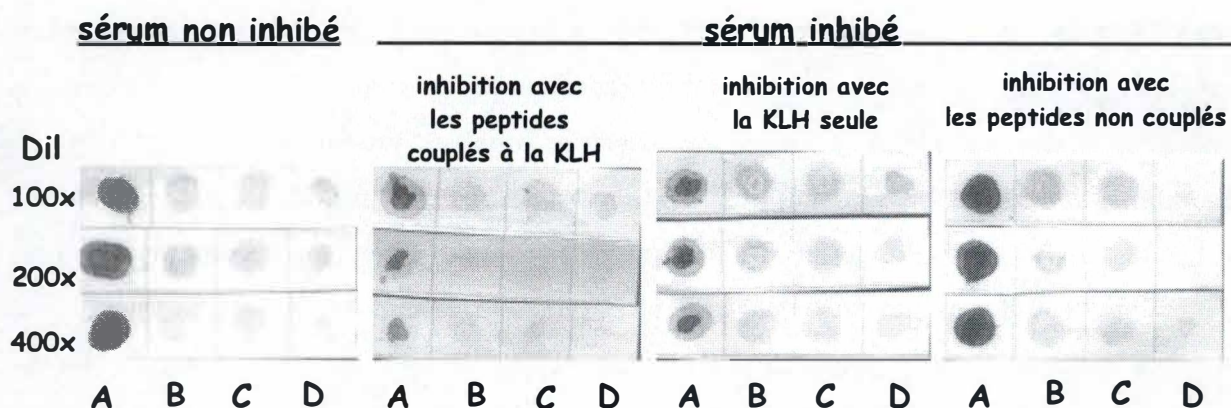


Figure 29 : Test dot-blot : Comparaison des effets inhibiteurs des peptides couplés à la KLH, de la KLH seule, des peptides non couplés sur la reconnaissance par le polysérum du lapin immunisé vis-à-vis de :

- (A) mélange de peptides couplés à la KLH
- (B) extrait protéique issu de la fraction insoluble (dil100x) d'une grande culture de BL21DE3 transformées avec le vecteur pET 17b-UDP-gldh
- (C) préparation protéique brute préparée à partir d'*E.coli* transformées avec le vecteur pET 17b sans insert
- (D) l'UDP-gldh recombinante purifiée

préparation d'anticorps positifs mais cette réponse spécifique est noyée dans du bruit de fond provenant de la reconnaissance des protéines d'*E. coli* par ces anticorps de poule. Ce bruit de fond disparaît en effet lorsque les anticorps sont mis en présence de l'UDPgldh recombinante purifiée et débarrassée des protéines d'*E. coli* par passage sur une colonne d'affinité (C). Comme précédemment, les anticorps préparés à partir d'un œuf récolté avant immunisation de la poule ne montrent aucune réponse vis-à-vis des antigènes testés. Des résultats tout à fait semblables (non montrés) ont été obtenus avec une préparation d'anticorps provenant d'un œuf récolté après le troisième rappel.

Au vu de ces résultats, nous avons choisi de poursuivre les manipulations avec le sérum de lapin, étant donné que ce dernier permet une détection nettement plus propre de l'UDP-gldh dans des extraits protéiques bactériens. Rappelons ici que notre but final est en effet de pouvoir utiliser le sérum pour la détection de l'UDP-gldh dans des extraits bruts de protéines végétales. La présence de nombreux anticorps anti-*coli* dans la préparation d'anticorps de poule pourrait constituer une source de bruit de fond non négligeable lors de la détection de la protéine cible dans des extraits végétaux. Il est à noter que des résultats semblables aux nôtres ont été obtenus par d'autres auteurs qui ont utilisé la même approche peptidique pour l'immunisation de lapins et de poules et qui ont constaté la présence d'un bruit de fond très élevé en Western-blot lors de l'utilisation des anticorps de poule, aux titres par ailleurs nettement plus faibles que les anticorps de lapin (Sheibani et Frazier, 1998).

8.2 Tests d'inhibition

La spécificité de la réponse du sérum du lapin immunisé vis-à-vis de l'UDP-gldh, a été confirmée par inhibition, où nous avons mélangé le sérum avec différents antigènes avant de le mettre en contact avec des molécules adsorbées sur la membrane de nitrocellulose. On mesure dans ce cas la réaction, avec les molécules immobilisées, des anticorps du sérum non associés aux antigènes testés en solution.

Nous avons tout d'abord comparé en dot-blot les effets inhibiteurs de : 1° le mélange de peptides couplés à la KLH, 2° la KLH seule et 3° le mélange des peptides non couplés. Nous avons veillé à garder proportionnellement les mêmes quantités de molécules inhibitrices dans les différents tests. Ainsi, le mélange de peptides couplés utilisé contenait respectivement 120 µg de chaque peptide et 360 µg de KLH, le mélange de peptides non

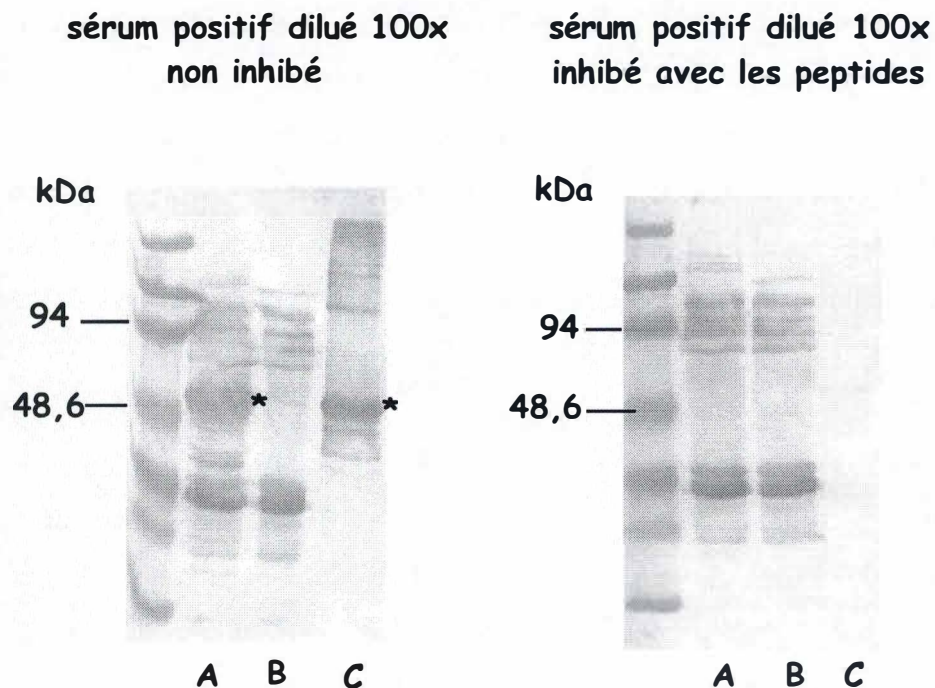


Figure 30 : Détection de l'UDP-gldh dans des extraits protéiques analysés en western-blot avec le sérum non inhibé et inhibé avec le mélange de peptides non couplés

- (A) extrait protéique issu de la fraction insoluble (dil100x) d'une grande culture de BL21DE3 transformées avec le vecteur pET 17b-UDP-gldh
- (B) extrait protéique brut préparé à partir de BL21DE3 transformées avec le vecteur pET 17b sans insert induit 3h à l'IPTG
- (C) protéine UDP-gldh recombinante purifiée

* bande attendue 56,4 kDa

couplés était composé de 120 µg de chacun des peptides, et 360 µg de KLH ont été employés pour les inhibitions avec la KLH seule. Les résultats obtenus sont présentés à la Figure 29. Comme on peut s'y attendre, par rapport au sérum non inhibé, la pré-incubation du sérum avec le mélange de peptides couplés à la KLH entraîne une forte diminution de la reconnaissance de ce même mélange immobilisé sur la membrane (A). Cette pré-incubation ne permet toutefois pas d'abolir totalement la réponse sur le mélange, même à la dilution la plus importante des anticorps. A une dilution 100x du sérum, la reconnaissance de l'UDP-gldh ne semble pas être fortement altérée par la pré-incubation du sérum avec le mélange de peptides couplés (D) : l'intensité des réponses obtenues avec le sérum inhibé et non inhibé sur cette protéine sont pratiquement identiques. Cet effet inhibiteur n'est visible qu'à partir d'une dilution 200x qui aboutit à une absence totale de réponse du sérum inhibé sur l'UDP-gldh purifiée (D).

Un même effet inhibiteur est obtenu par pré-incubation du sérum avec le mélange de peptides non couplés, et ce déjà pour une dilution 100x de ce dernier : aucune détection de l'UDP-gldh n'est observée dans ce cas. De manière logique, la pré-incubation du sérum avec la KLH n'a aucune influence sur la reconnaissance de l'UDP-gldh par les anticorps. Seule la réponse vis-à-vis du mélange de peptides couplés à la KLH est affectée, mais cependant non abolie. Ajoutons que la réaction du sérum avec les extraits protéiques bruts contenant (B) ou non (C) de l'UDP-gldh n'est pratiquement pas modifiée par les différents antigènes utilisés pour les inhibitions. Nous mesurons donc dans ce cas la réponse basale du sérum vis-à-vis des protéines de *coli*.

Considérant l'inhibition par le mélange de peptides non couplés plus efficace, nous l'avons appliquée en Western-blot, dans le but de pouvoir mettre en évidence une abolition de la reconnaissance par le sérum de la bande spécifique correspondant à l'UDP-gldh suite à l'inhibition. C'est ce que nous observons effectivement sur la Figure 30 où l'UDP-gldh, présente dans les extraits de protéines insolubles préparées à partir de bactéries transformées avec le vecteur pET 17b-UDP-gldh (A) et dans la préparation d'UDP-gldh purifiée (colonne C), n'est plus reconnue suite à l'inhibition. De plus, nous pouvons constater que la reconnaissance des protéines de poids moléculaires supérieurs ou inférieurs à l'UDP-gldh, présentes dans la fraction d'UDP-gldh purifiée (C), disparaît également suite à la pré-incubation du sérum avec le mélange de peptides non couplés. Ceci confirme l'hypothèse que nous avons émise précédemment, à savoir que ces protéines correspondent respectivement à

des agrégats et à des produits de dégradation ou de synthèse incomplète de l'UDP-gldh. Signalons pour terminer que, comme dans les dot-blots, la reconnaissance des protéines de *coli* par le sérum n'est pas affectée par l'étape de pré-incubation : ces protéines, présentes dans les extraits préparés à partir de bactéries contenant (A) ou non (B) le vecteur pET 17b recombinant sont détectées de la même façon par le sérum, qu'il soit inhibé ou non.

Nous avons donc montré, à ce stade de notre travail, que l'approche peptidique d'immunisation que nous avons utilisée permettait d'obtenir, chez le lapin, un sérum capable de reconnaître spécifiquement l'UDP-gldh et présentant un faible bruit de fond vis-à-vis de protéines de *coli*. Nous avons donc entrepris, dans une étape finale, d'évaluer la capacité de ce sérum à détecter l'UDP-gldh dans des extraits de protéines végétales.

8.3 Détection d'UDP-gldh dans des extraits végétaux

La littérature indiquant que l'UDP-gldh est caractéristique de cellules et/ou tissus en croissance (cfr Introduction), nous avons choisi de préparer des extraits protéiques au départ de cellules de carottes cultivées en suspension (culture de deux jours contenant des cellules se divisant activement). Nous avons appliqué le protocole décrit par Tenhaken et Thulke (1996) dans le cas de cellules en suspension de soja. Les extraits obtenus ont été analysés en dot-blot et Western-blot où nous les avons incubés avec le polysérum de lapin. Aucune présence significative d'UDP-gldh n'a pu être mise en évidence dans ces extraits. Nous n'avons pas eu le temps de procéder à d'autres types d'extraction ou d'appliquer le protocole utilisé sur d'autres matériaux pour évaluer le potentiel du sérum généré. Ceci termine la description des résultats que nous avons obtenus durant ce travail.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

1. DISCUSSION GENERALE

Comme nous l'avons souligné dans notre introduction, la biosynthèse de la paroi résulte d'un processus complexe, nécessitant l'intervention de nombreuses enzymes en majeure partie encore non identifiées au niveau moléculaire. Le regain d'intérêt manifesté depuis peu pour ce domaine de recherche met l'accent sur un manque d'outils spécifiques, tels des anticorps, pour la détection de ces enzymes, ceci afin de mieux comprendre le rôle joué par la paroi dans le contrôle de la croissance et de la différenciation cellulaire végétale.

Dans ce contexte, notre laboratoire a mis sur pied un projet visant à générer un pool de sondes dirigées contre des enzymes impliquées dans la synthèse des polysaccharides pariétaux. C'est dans le cadre de ce projet que s'inscrit ce mémoire dont l'objectif est d'obtenir et caractériser des anticorps dirigés contre l'UDP-glucose déhydrogénase, enzyme qui intervient dans la voie de synthèse des précurseurs diphosphonucléosidiques nécessaires pour l'assemblage des pectines et hémicelluloses de la paroi cellulaire végétale.

Lors de ce travail nous avons immunisé un lapin et une poule avec un mélange de deux peptides de synthèse couplés à la KLH choisis dans des zones conservées d'une UDP-gldh d'*Arabidopsis*. Etant donné que le but final de ce travail était d'obtenir des réactifs immunologiques spécifiques des UDP-gldh végétales, il s'est avéré indispensable d'évaluer la reconnaissance d'UDP-gldh entières par les anticorps des animaux immunisés avec les peptides. Dès lors, nous avons procédé au clonage du gène correspondant à cette UDP-gldh de manière à la faire produire par des bactéries sous forme recombinante. Ainsi, nous avons tout d'abord amplifié le gène correspondant à l'UDP-gldh de référence à partir d'ADNc d'*Arabidopsis thaliana* et l'avons cloné dans le vecteur d'expression bactérien pET 17b. L'UDP-gldh recombinante (UDP-gldh-T7tag), produite par des bactéries BL21DE3 transformées, a été identifiée sur gels SDS-PAGE.

L'étape suivante des manipulations a permis de démontrer que les anticorps des animaux immunisés avec les peptides étaient effectivement capables de reconnaître l'UDP-gldh recombinante produite. Cette réponse spécifique est toutefois accompagnée, dans le cas des anticorps de poule, d'un background particulièrement élevé dû à la fixation d'anticorps sur

des protéines de *coli*. Pour cette raison, nous avons abandonné les expériences réalisées avec les œufs de poule.

Le sérum de lapin obtenu a été utilisé afin de détecter la présence d'UDP-gldh dans des extraits végétaux. Nous avons réalisé des extractions protéiques à partir de cellules de carottes issues d'une culture en suspension de deux jours, c'est à dire en pleine croissance active, et avons donc procédé à des tests de type dot-blot et Western-blot sur ces extraits. Malheureusement, aucune bande spécifique d'un poids moléculaire attendu de 56,4 kDa n'a pu être visualisée en Western-blot avec ce polysérum.

On peut donc conclure que le sérum obtenu à partir du lapin immunisé avec les peptides de synthèse et couplés à la KLH, reconnaît effectivement une UDP-gldh entière exprimée sous forme recombinante. Le réactif immunologique obtenu chez le lapin est donc spécifique de la séquence d'UDP-gldh choisie comme référence et sur base de laquelle les peptides ont été synthétisés. L'approche peptidique utilisée est une alternative à l'obtention de réactifs immunologiques par immunisation d'animaux avec une protéine entière exprimée en bactérie et purifiée avant l'injection. Rappelons que cette méthode utilisée au laboratoire dans le cadre du projet de génération de sondes immunologiques contre des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la paroi a l'inconvénient majeur d'être longue et d'autant plus fastidieuse qu'il est nécessaire d'obtenir une protéine la plus pure possible afin d'éviter les réponses non spécifiques des animaux immunisés avec cette préparation.

L'approche peptidique présente ainsi l'avantage d'un gain de temps précieux. Toutefois le polysérum obtenu chez le lapin suite à l'immunisation doit encore être purifié afin d'obtenir un réactif immunologique mono-spécifique.

2.PERSPECTIVES

Nous avons donc obtenu un réactif immunologique spécifique de l'UDP-gldh entière en utilisant l'approche peptidique pour les immunisations. Outre le fait que le polysérum devrait être obtenu au départ de plusieurs animaux pour limiter la variabilité de la réponse antigénique inhérente aux individus, deux objectifs subsistent dans le cadre de ce travail.

Tout d'abord, nous devons obtenir une purification plus poussée du sérum obtenu chez le lapin. Cette purification peut être envisagée par chromatographie d'affinité en utilisant une matrice sur laquelle les peptides utilisés pour l'immunisation sont greffés. De cette façon ne seront retenus sur la colonne et récupérés que les anticorps spécifiques des peptides de l'UDP-gldh, ceci afin d'éliminer le signal non spécifique dû aux anticorps répondant contre des protéines de *coli*.

Deuxièmement, ce sérum devrait être testé sur des extraits cellulaires végétaux autres que les cellules en suspension de carotte utilisées dans ce travail. Ainsi, la mise en évidence la présence d'UDP-gldh à l'aide de notre sérum nécessitera d'évaluer plusieurs techniques d'extraction appliquées à différents tissus prélevés sur des végétaux appartenant à des familles botaniques distinctes. La technique de Western-blot devra aussi être adaptée à une méthode de détection beaucoup plus sensible que l'habituelle détection colorimétrique utilisée jusqu'ici. Une détection par chimioluminescence a fait ses preuves au laboratoire pour la mise en évidence d'autres enzymes impliquées dans la synthèse de la paroi cellulaire végétale, mais présentes à des teneurs indécélables par les méthodes classiques.

Une telle mise au point fournirait alors un outil précieux à l'étude du métabolisme des polysaccharides pariétaux des végétaux.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Bevan, M., Mayer, K., White, O., Eisen, J.A, Preuss, D., Bureau, T., Salzberg, S.L, Mewes, H.W. (2001) Sequence and analysis of the *Arabidopsis* genome, Current Opinion in plant biology **4** : 105-110.

Bonin, C.P., Potter, I., Vanzin, G.F., Riter, W.D. (1997) The *MURI* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes an isoform of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase, catalyzing the first step in the *de novo* synthesis of GDP-L-fucose, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **94** : 2085-2090.

Brett, C., Waldron, K. (1990) Physiology and biochemistry of plant cell walls in Topics in plant physiology, **2**, Black and Chapman (Eds), Unwin Hyman Ltd, London.

Buckeridge, M.S., Vergara, C. E., Carpita, N. C. (1999) The mechanism of synthesis of a mixed-linkage (1→3), (1→4) β-D-Glucan in maize. Evidence for multiple sites of glycosyl transfer in the synthase complex, Plant Physiol. **120** : 1105-1116.

Carpita, N., Gibeaut, D. (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: : consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth, Plant Journal **3** : 1-30.

Carpita, N.C., McCann, M. (2000) Cell Wall Biosynthesis and Assembly in Biochemistry & Molecular Biology of Plants, Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R. L. (Eds), American society of plant physiologists, pp 83-87.

Chapple, C., Carpita, N., (1998) Plant cell walls as targets for biotechnology, Current Opinion in plant biology **1** : 179-185.

Chengappa, S., Guilleroux M., Phillips W., Shields, R. (1999) Transgenic tomato plants with decreased sucrose synthase are unaltered in starch and sugar accumulation in the fruit, Plant Molecular Biology **40** : 213-221.

Dörmann, P., Benning, C. (1998) The role of UDP-glucose epimerase in carbohydrate metabolism of *Arabidopsis*, The Plant Journal **13**(5) : 641-652

Duggha, K.S., Tiwani, S.C., Ray, P.M. (1997) A reversible glycosylated polypeptide (RGP1) possibly involved in plant cell wall synthesis : Purification, gene cloning, and trans-Golgi localization, Pro. Natl. Acad. Sci.USA **94** : 7679-7684.

Eckardt, N.A., (2001) *Arabidopsis* genome conference 2000 : How a small weed changed the world, The plant cell **13** : 5-10.

Edwards, M.E., Dickson, C.A., Chengappa, S., Sidebottom, C., Gidley, M.J., Reid, J.S Grant (1999) Molecular characterisation of a membrane-bound galactosyltransferase of plant cell wall matrix polysaccharide biosynthesis, The Plant Journal **19**(6) : 691-697.

Goubet, F., Mohen, D., (1999) Subcellular localization and topology of homogalacturonan methyltransferase in suspension-cultured *Nicotiana tabacum* cells, Planta **209** : 112-117.

Hempel, J., Perozich, J., Romovacek, H., Hinich, A., Kuo, I., Feingold, D.S. (1994) UDP-glucose dehydrogenase from bovine liver : Primary structure and relationship to other dehydrogenases, *Protein science* **3** : 1074-1080.

Keegstra, K., Kende, H., Raikhel, N., Walton, J., Wilkerson, C. (2000) Cell wall metabolism in MSU-DOE, Plant research laboratory, Annual report 2000 : 103-108.

Keegstra, K., Raikhel, N. (2001) Plant glycosyltransferases, *Current opinion in plant biology* **4** : 219-224.

Keller, R., Springer, F., Renz, A., Kossmann, J., (1999) Antisense inhibition of the GDP-mannose pyrophosphorylase reduces the ascorbate content in transgenic plants leading to developmental changes during senescence, *The Plant Journal* **19**(2) : 131-141

Lösch, U., Schraner, L., Wanke, R., Jurgens, L. (1986) The chicken egg, an antibody source, *J.Vet. Med. B.*, **33** : 609-619.

Martin, T., Frommer, W.B., Salanoubat, M., Willmitzer, L., (1993) Expression of an *Arabidopsis* sucrose synthase gene indicates a role in metabolization of sucrose both during phloem loading and in sink organs, *The Plant Journal* **4**(2) : 367-377

Mohnen, D. (1999) Biosynthesis of pectins and galactomannans in *Comprehensive natural products chemistry*, **3**, Carbohydrates and their derivatives including tannins, cellulose, and related lignins, Elsevier Pinto BM. (Eds), Oxford, pp 497-527.

Monnier, A-L. (1999) Une nouvelle clé de la croissance cellulaire, *Biofutur* **192** : 10.

Nebenfurhr, A., et Staehelin, L.A. (2001) Mobile factories : Golgi dynamics in plant cells, *Trends in plant science*, **6**, avril 160-167.

Northcote, D.H. (1985) Control of cell wall formation during growth, in *Biochemistry of plant cell walls*. CT.Brett & J.R Hillman (Eds) Society for experimental biology, Seminar series 28, Cambridge University Press, pp 177-197.

Perrin, R.M., DeRocher, A.E., Bar-Peled, M., Zeng, W., Norambuena, L., Orellana, A., Raikhel, N.V., Keegstra, K (1999) Xyloglucan fucosyltransferase, an enzyme involved in plant cell wall biosynthesis, *Science* **284** : 1976-1979.

Reid, J.S. (2000) Cementing the cell wall: cell wall polysaccharides synthesising enzymes, *Current Opinion in Plant Biology* **3** : 512-516.

Reiter, W.D., Chapple, C., Somerville, C.R. (1997) Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered cell wall polysaccharide composition, *The Plant Journal* **12**(2) : 335-345.

Richter, G., (1993) Métabolisme des végétaux, *Physiologie et biochimie*, Presses polytechniques et universitaires romandes (Eds) pp 189-220.

Roberts, K. (2001) How the cell wall acquired a cellular context, *Plant physiol.* **125**: 127-130.

Robertson, D., Smith, C., Bolwell, G. P. (1996) Inducible UDP-glucose dehydrogenase from French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) locates to vascular tissue and has alcohol dehydrogenase activity, *Biochemistry* **313** : 311-317.

Scheller, H.V., Doong, R.L., Ridley, B.L., Mohnen, D. (1999) Pectin biosynthesis : a solubilized α 1,4-galacturonosyltransferase from tobacco catalyses the transfer of galacturonic acid from UDP-galacturonic acid onto the non-reducing end of homogalacturonan, *Planta* **207** : 512-517.

Seitz, B., Klos, C., Wurm, M., Tenhaken R. (2000) Matrix polysaccharide precursors in *Arabidopsis* cell walls are synthesized by alternate pathways with organ-specific expression patterns, *The Plant Journal* **21**(6) : 537-546.

Smith, C.J. (1993) Carbohydrate chemistry in Plant biochemistry and molecular biology, P.J. Lea and R.C.Leegood (Eds), pp 74-110.

Tenhaken, R., Thulke, O. (1996) Cloning of an enzyme that synthesizes a key nucleotide-sugar precursor of hemicellulose biosynthesis from soybean : UDP-glucose dehydrogenase, *Plant Physiol.* **112** : 1127-1134.

Villand, P., Olsen, O-A., Kleczkowski, L.A. (1993) Molecular characterization of multiple cDNA clones for ADP-glucose pyrophosphorylase from *Arabidopsis thaliana*, *Plant Molecular Biology* **23** : 1279-1284.

Wulff, C., Norambuena, L., Orellana, A. (2000) GDP-fucose uptake into the Golgi apparatus during xyloglucan biosynthesis requires the activity of a transporter-like protein other than the UDP-glucose transporter, *Plant Physiol.* **122** : 867-877.

Yuan, L., Knauf, V.C., (1997) Modification of plant components, *Current Opinion in Biotechnology* **8** : 227-233.

<http://www.sph.jhu.edu>

<http://www.appliedbiosystems.com>

<http://arabidopsis.org/workshop1.html>

<http://www.bch.msu.edu/faculty/kindel.htm>

<http://www.plbio.kvl.dk/plbio/cellwall.htm>

<http://www.pre.msu.edu/keegstra.htm>

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

1. LA COMPLEXITE DE LA PAROI CELLULAIRE VEGETALE	1
2. LA BIOSYNTHESE DE LA PAROI CELLULAIRE VEGETALE	2
2.1 Le processus de biosynthèse	2
2.1.1 La formation des précurseurs	2
2.1.2 La polymérisation	3
2.1.3 Les modifications post-synthétiques	4
2.2 Le contrôle de la biosynthèse	4
2.3 L'approche moléculaire de la biosynthèse de la paroi cellulaire végétale	5
3. L'URIDINE DIPHOSPHATE GLUCOSE DEHYDROGENASE	8
3.1 Présentation générale de l'UDP-gldh	8
3.2 Isolement et caractérisation d'UDP-gldh végétales	8
3.3 Rôle régulateur de l'UDP-gldh dans la biosynthèse de la paroi.	10
4. LA PRODUCTION D'ANTICORPS CONTRE DES ENZYMES IMPLIQUEES DANS LA SYNTHÈSE DE LA PAROI	11
5. BUT DU MEMOIRE	13

MATERIEL ET METHODES

1. SYNTHÈSE D'ADN COMPLEMENTAIRE	14
Principe	14
Matériel	14
Protocole	14
2. PCR (Polymerase Chain Reaction)	15
Matériel	15
Protocoles	15
2.1 Amplification du gène de l'UDP-gldh à partir d'ADNc	15
2.2 Amplification des inserts clonés dans pCRII (PCR sur colonies)	16
2.3 Amplification des inserts clonés dans pET 17b (PCR sur colonies)	17
3. SEQUENCAGE DU GENE CLONE DANS LE VECTEUR pCRII	17
Matériel	17
Protocoles	18
3.1 PCR de préséquencage	18
3.2 Purification des produits PCR	18
3.3 Quantification sur gel d'agarose du produit PCR purifié	18
3.4 Préparation des échantillons à envoyer au séquençage	19
4. GELS D'AGAROSE ET DEPOT DES ECHANTILLONS	19
Principe	19
Matériel	19
Protocoles	20
4.1 Gel analytique	20
4.2. Gel préparatif	20
4.3. Gel de quantification	20
5. EXTRACTION-PURIFICATION D'ADN DECOUPE DU GEL D'AGAROSE.	21
Principe	21
Matériel	21
Protocole	21
6. LIGATION	22
Principe de la ligation dans pCRII	22
Matériel	22
Protocole	22
Vecteur pET17b	23
Protocole	23
7. TRANSFORMATION DES BACTERIES CHIMIOCOMPETENTES	23
Principe	23
Matériel	23
Protocoles	23
7.1 Transformation de bactéries TOP10 avec pCRII-UDP-gldh ou pET17b-UDP-gldh	23

7.2 Transformation de bactéries BL21DE3	24
7.3 Transformation des bactéries BL21DE3 star.....	24
8. PREPARATION D'ADN PLASMIDIQUE OU MINIPREP	25
Matériel.....	25
Protocole.....	25
9. RESTRICTION	26
Matériel.....	26
Protocole.....	26
10. CULTURES BACTERIENNES	27
Matériel.....	27
Protocoles	27
10.1 Petite culture de 5ml	27
10.2 Petite culture en vue d'une cinétique d'induction.....	27
10.3 Grande culture en vue de la constitution d'un stock de la protéine d'intérêt.....	28
10.4 Culture en vue de l'isolement de la protéine d'intérêt par le «T7-Tag affinity purification kit»	28
11. EXTRACTION DES PROTEINES D'INTERET	28
Matériel.....	28
Protocoles	29
11.1 Extraction au départ de 500 µl de suspension bactérienne	29
11.2 Extraction au départ de 1 litre de suspension bactérienne	29
11.3 Extraction au départ de 100 ml de suspension bactérienne, en vue de l'isolement de la protéine d'intérêt avec le « T7-Tag affinity purification kit » (Novagen)	30
12. PURIFICATION DES PROTEINES AVEC LE «T7-Tag AFFINITY PURIFICATION KIT».....	30
Principe.....	30
Matériel.....	31
Protocole.....	31
13. CONCENTRATION DES PROTEINES	31
Matériel.....	31
Protocole.....	32
14. ELECTROPHORESE EN GEL SDS-PAGE (méthode de Laemmli)	32
Matériel.....	32
Protocoles	32
14.1 Préparation des gels.....	32
14.2 Chargement des échantillons et migration	33
14.3 Détection des protéines	33
15. DOT-BLOT ET WESTERN-BLOT	33
Principe.....	33
Matériel.....	34
Protocoles	34
15.1 Dot- blot.....	34
15.2 Western - blot	35
16. IMMUNISATIONS	36
Matériel.....	36
Protocole.....	36
16.1 Isolement d'anticorps de lapin.....	37
16.2 Isolement d'anticorps à partir d'œuf de poule	37
Matériel.....	37
Protocole.....	37
17. EXTRACTION DE PROTEINES VEGETALES	38
Matériel.....	38
Protocole.....	38
18. DOSAGE DE PROTEINES	38
Matériel.....	38
Protocole.....	38

RESULTATS ET DISCUSSION

1. LA DEMARCHE SUIVIE	39
2. RECHERCHES DANS LES BANQUES DE DONNEES ET CHOIX DES PEPTIDES EN VUE DES IMMUNISATIONS.....	40

4. LE CLONAGE DU GENE DE L'UDP-GLDH.....	42
5. LE SOUS-CLONAGE DE L'UDP-GLDH DANS UN VECTEUR D'EXPRESSION	44
5.1 Principe de l'expression en pET	44
5.2 Le clonage.....	45
6. EXPRESSION DE LA PROTEINE D'INTERET PAR DES BACTERIES BL21DE3	46
7. PURIFICATION DE L'UDP-GLDH RECOMBINANTE.....	47
8. CARACTERISATION DES REPONSES ANTI-PEPTIDES D'UDP-GLDH	49
8.1 Dot-blots et Western-blots	49
8.2 Tests d'inhibition	51
8.3 Détection d'UDP-gldh dans des extraits végétaux.....	53

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

1. DISCUSSION GENERALE.....	54
2.PERSPECTIVES	56

BIBLIOGRAPHIE.....	57
--------------------	----